



Università degli Studi
di Palermo



Dipartimento di Biopatologia
Biotecnologie Mediche e Forensi



Istituto di Biomedicina e
Immunologia Molecolare



Ministero dell'Istruzione
dell'Università e della Ricerca

Dottorato di Ricerca in Immunofarmacologia XXI Ciclo

Coordinatore: Prof. Francesco Dieli

Settore Scientifico Disciplinare MED/04

RUOLO DELL'EPITELIO RESPIRATORIO NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA DEI PAZIENTI CON BPCO

Candidata

Dott.ssa Maria Ferraro

Tutor

Dott.ssa Anna Flugy

Co-Tutor

Dott.ssa Elisabetta Pace

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA: DEFINIZIONE E PREVALENZA	3
CLASSIFICAZIONE DI GRAVITÀ	5
FATTORI DI RISCHIO DI BPCO.....	6
RUOLO DELL'EPITELIO RESPIRATORIO E RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA.....	10
RECETTORI TOLL LIKE (TLR).....	11
LA TERAPIA FARMACOLOGICA DELLA BPCO.....	15
OBIETTIVI DELLA RICERCA.....	18
MATERIALI E METODI.....	19
CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI.....	19
IMMUNOISTOCHEMICA.....	20
QUANTIZZAZIONE DELLA COLORAZIONE.....	21
MICRODISSEZIONE LASER	22
REAL TIME PCR.....	22
PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO DI FUMO DI SIGARETTA (CSE)	23
TRATTAMENTO DELLE CELLULE EPITELIALI BRONCHIALI 16HBE.....	24
CITOFUORIMETRIA	25
WESTERN BLOT	26
CHIP ASSAY	27
CHEMIOTASSI DEI NEUTROFILI E LINFOCITI	28
ELISA	28
STATISTICA.....	29
RISULTATI	30
CARATTERISTICHE DEMOGRAFICHE DEI PAZIENTI.....	30
ESPRESSIONE DI TLR4 NELL'EPITELIO DELLE VIE AEREE DISTALI E CENTRALI	31
ESPRESSIONE DI HBD2 NELL'EPITELIO DELLE VIE AEREE CENTRALI E DISTALI	33
ESPRESSIONE DI mRNA PER HBD2 NELL'EPITELIO BRONCHIALE MICRODISSECATO	36
EFFETTI IN VITRO DELL'ESTRATTO DI FUMO DI SIGARETTA SULLE CELLULE EPITELIALI BRONCHIALI.....	37
EFFETTI DEL CILOMILAST SULL'ESPRESSIONE DEL TLR4	40
EFFETTI DEL CILOMILAST SUL RILASCIO DI IL-8 ED IP-10	41
EFFETTI DEL CILOMILAST SULLA CHEMIOTASSI DEI NEUTROFILI	42
EFFETTI DEL CILOMILAST SULLA CHEMIOTASSI DEI LINFOCITI	43
EFFETTI DEL CILOMILAST SUL PATHWAY DI NFκB ED ERK	45
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	50
BIBLIOGRAFIA	66

INTRODUZIONE

Broncopneumopatia cronica ostruttiva: definizione e prevalenza

La BPCO (broncopneumopatia cronico-ostruttiva) è caratterizzata da una progressiva e per lo più irreversibile ostruzione delle vie aeree, supportata da un afflusso nel polmone di cellule infiammatorie che stabiliscono interazioni complesse e molto dinamiche con cellule residenti, come le cellule epiteliali (1-2). L'acronimo BPCO raggruppa malattie respiratorie diverse, come la bronchite cronica e l'enfisema polmonare, caratterizzate da un denominatore comune costituito dalla riduzione stabile del flusso espiratorio forzato, valutato con il parametro spirometrico FEV1.

La complessità della BPCO è dovuta al coinvolgimento di alterazioni strutturali (infiammazione cronica e rimodellamento) sia delle vie aeree, centrali e periferiche, che del parenchima polmonare.

La riduzione del flusso aereo che caratterizza tale patologia, è associata a una eccessiva risposta infiammatoria dei polmoni a particelle nocive e gas (3) ed è causata da almeno tre meccanismi:

a) perdita di elasticità e distruzione degli “attacchi alveolari” delle vie aeree all'interno del polmone come risulta nell'enfisema, ciò porta alla

riduzione del ritorno elastico polmonare e alla chiusura delle piccole vie aeree durante l'espiazione;

b) alterazioni a carico delle piccole vie aeree (bronchiolite ostruttiva) e conseguente ispessimento delle pareti dovuto sia all'infiltrazione delle cellule infiammatorie che a cambiamenti strutturali;

c) ostruzione delle piccole vie aeree a seguito della secrezione mucosa.

Negli ultimi decenni tale malattia è divenuta un vero e proprio problema sociale, la BPCO rappresenta infatti la quarta causa di morte negli USA, dopo le cardiopatie, le neoplasie e le malattie cerebrovascolari e la terza in Europa. Si prevede che tra circa dieci anni costituirà in assoluto in tutto il mondo, la quinta malattia più frequente e la terza causa di morte. La prevalenza di questa malattia nella popolazione adulta è del 6-8% e colpisce in genere soggetti di età superiore ai 55-60 anni (4). A seconda della severità della BPCO, il tasso di mortalità a 5 anni varia dal 40% al 70%. Ciò significa che, pur essendo la BPCO fondamentalmente una malattia infiammatoria cronica di tipo benigno, essa presenta a lungo termine, una prognosi severa con un tasso di mortalità molto alto legata a complicanze della BPCO, nonché a neoplasie polmonari e malattie cardiovascolari. Diversi sono gli studi che mostrano un incremento del rischio di mortalità nelle fasi di riacutizzazione della BPCO. La tendenza

in aumento nell'incidenza della BPCO, sia in termini di morbidità che di mortalità, porta ad un incremento progressivo dei costi sociali che è da ricondurre all'abuso del fumo di tabacco e all'aria che respiriamo sempre più inquinata, tali fattori associati all'allungamento della vita media fanno sì che tale patologia sia più diffusa nei paesi più industrializzati.

Da qui l'importanza di una diagnosi precoce e di terapie mirate della BPCO, al fine di ridurre il deterioramento della funzione polmonare e migliorare la qualità di vita dei pazienti.

E' quindi necessario stimolare la ricerca, sia di base che clinico-farmacologica, al fine di approfondire e ampliare le conoscenze dei meccanismi che sottendono questa importante patologia per migliorarne il controllo e ridurre la mortalità.

Classificazione di gravità

La classificazione più comunemente utilizzata si basa sulla stadiazione proposta dalle linee guida internazionali GOLD (Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease) (4) per la diagnosi, la gestione e la prevenzione della BPCO e prevede 5 stadi di gravità compreso uno stadio 0 di soggetti a rischio (Tab. 1). Tale classificazione tiene conto dei valori di funzionalità respiratoria ed in particolare dell'entità di ostruzione bronchiale, valutata dai parametri: FEV1, volume espiratorio

forzato in un 1 secondo dopo broncodilatazione e FEV1/FVC o indice di Tiffeneau ovvero la capacità vitale forzata in 1 secondo. L'entità dell'ostruzione bronchiale e pertanto della gravità della BPCO è perciò valutata mediante un esame spirometrico, che costituisce la tecnica di misurazione della funzionalità respiratoria più diffusa e riproducibile (5).

STADIO	CARATTERISTICHE
0: a rischio	Sintomi cronici (tosse, espettorazione) spirometria normale
I: lieve	FEV1/FVC<70%; FEV1>80% del teorico tosse cronica con espettorato
II: moderata	FEV1/FVC<70%; 50%≤FEV<80% del teorico tosse cronica con espettorato, dispnea da sforzo
III: grave	FEV1/FVC<70%; 30%≤FEV<50% del teorico sintomi progressivi, frequenti riacutizzazioni, qualità di vita compromessa
IV: molto grave	FEV1/FVC<70%; FEV<30% del teorico qualità di vita gravemente compromessa riacutizzazioni anche mortali

Tab. 1 Classificazione di gravità della BPCO. FEV1: volume espiratorio forzato in un 1 secondo; FEV1/FVC o indice di Tiffeneau (capacità vitale forzata in 1 secondo)

Fattori di rischio di BPCO

La BPCO è una malattia ad eziologia multifattoriale, ossia è dovuta a una serie di fattori di rischio esogeni ed endogeni che, singolarmente o in sinergia, determinano il grado di suscettibilità del soggetto allo sviluppo della malattia. I fattori che favoriscono l'insorgenza della BPCO possono

essere divisi in endogeni ed esogeni (Tab. 2). Tra questi ultimi il principale è il fumo di sigaretta, seguito dagli inquinanti atmosferici (gassosi e particolati), sia esterni (inquinamento da traffico veicolare, inquinanti chimici industriali, ecc.), che interni (abitazioni e luoghi di lavoro).

FATTORI DI RISCHIO ENDOGENI	FATTORI DI RISCHIO ESOGENI
<ul style="list-style-type: none"> • Razza • Sesso • Anamnesi familiare positiva per BPCO • Pattern genico predisponente lo sviluppo di BPCO • Deficit di α-1-antitripsina • Basso peso alla nascita • Malattie respiratorie durante l'infanzia • Atopia (elevati livelli di IgE) • Iper-reattività bronchiale • Suscettibilità individuale ai fattori di rischio 	<ul style="list-style-type: none"> • Fumo di tabacco • Esposizione lavorativa • Inquinamento outdoor • Inquinamento indoor • Esposizione a fumo di tabacco ambientale • Abuso di alcool • Dieta povera di frutta • Basso livello di stato socio-economico

Tab.2 Fattori di rischio di BPCO

L'ipotesi che, insieme alla componente patogenetica esogena ve ne sia una endogena di predisposizione individuale, è confermata dal fatto che non tutti i fumatori, anche tra i più forti, contraggono la malattia. Si ritiene che abbia importanza anche l'esposizione precoce, nell'infanzia, a fattori di rischio ambientali. Sui fattori genetici coinvolti nella patogenesi della BPCO, oggi si conosce molto poco, l'unica anomalia fino ad ora

identificata che ha un ruolo accertato, è il deficit ereditario di α_1 -antitripsina, una glicoproteina ad attività antiproteasica prodotta dal fegato. Tale proteina diffonde dal sangue nelle strutture alveolari dove esercita una funzione protettiva, tutelando l'integrità del parenchima polmonare dall'effetto autolesivo degli enzimi proteolitici rilasciati soprattutto dai neutrofili. L'eredità in omozigosi di tale mutazione comporta una ridotta disponibilità dell'antiproteasi con conseguente spostamento dell'equilibrio proteasi - antiproteasi verso la distruzione del polmone e relativo enfisema.

Il fumo di sigaretta rappresenta per l'80-90% il principale fattore di rischio nell'insorgenza della BPCO, l'esposizione cronica al fumo di tabacco aumenta di circa 10 volte il rischio di contrarre la malattia, accelerando il declino fisiologico della funzione respiratoria. Le particelle tossiche e volatili presenti nel fumo hanno un ruolo chiave nel determinare alcuni eventi considerati cruciali nella patogenesi della BPCO. Tra questi l'infiammazione del polmone dovuta al richiamo di macrofagi e neutrofili; l'aumento dello stress ossidativo; un alterato equilibrio tra le proteasi e l'antiproteasi nel polmone (6); l'ipersecrezione mucosa, determinata da iperplasia ghiandolare e incremento numerico delle cellule caliciformi presenti a livello

dell'epitelio; la riduzione dell'efficienza della clearance mucociliare, a causa di un' alterazione dell'integrità strutturale dell'epitelio e paralisi del battito ciliare (Fig. 1). Tutta questa serie di eventi determinano un danno tissutale che oltre a creare un vero e proprio ingombro a livello delle vie aeree, ne aumentano la suscettibilità alle infezioni i cui agenti eziologici prevalenti sono lo *Streptococcus pneumoniae*, l'*Haemophilus influenzae*, lo *Pseudomonas aeruginosa*.

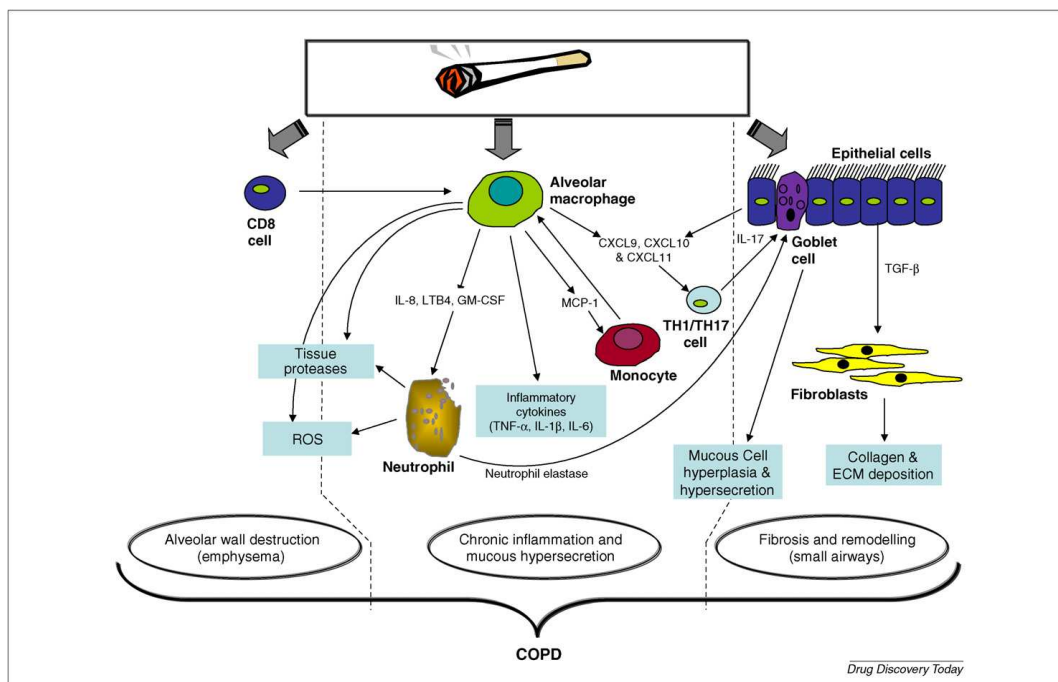


Fig. 1 Risposta infiammatoria al fumo di sigaretta e patogenesi BPCO

L'infiammazione a livello del polmone, può essere anche una conseguenza dell'attivazione della risposta innata alle particelle tossiche e ai gas presenti nel fumo di sigaretta (8). A livello clinico, la BPCO è

caratterizzata dalla presenza di ricorrenti infezioni delle vie aeree che giocano un ruolo cruciale nella progressione della malattia e nel declino della funzione respiratoria (9-10).

Ruolo dell'epitelio respiratorio e risposta immunitaria innata

L'epitelio respiratorio rappresenta una delle porte d'ingresso per i patogeni e utilizza i meccanismi di difesa dell'immunità innata per prevenirne l'infezione e la colonizzazione (11). Non rappresenta quindi una semplice e statica barriera meccanica, ma un'importante interfaccia con l'ambiente, un sistema dinamico che partecipa attivamente alla risposta immunitaria. L'epitelio delle vie aeree previene la colonizzazione dei patogeni inalati in tre modi: 1) grazie al movimento fisico delle ciglia e alla tosse; 2) mediante il rilascio di sostanze ad azione antimicrobica diretta come il lisozima, la lattoferrina, le β -defensine, l'ossido nitrico (NO); 3) inducendo un network di segnalazioni che determinano in prima linea il reclutamento dei fagociti e successivamente, se necessario, l'instaurarsi dell'immunità adattativa (12). Una componente chiave dell'immunità naturale e dei meccanismi di difesa naturali contro le infezioni batteriche è rappresentata dalla famiglia dei recettori toll like (TLR) (13).

Recettori Toll Like (TLR)

Il gene codificante la proteina recettoriale “toll” venne identificato, circa 20 anni or sono, come protagonista delle risposte difensive antimicrobiche umorali e cellulari della *Drosophila*. Solo qualche anno più tardi, recettori con analoga funzione vennero identificati nel mammifero. Fino ad oggi si conoscono nell’uomo 10 differenti proteine transmembrana appartenenti alla famiglia TLR, capaci di riconoscere sia componenti virali che batteriche. I TLR sono espressi da diversi tipi cellulari: cellule dendritiche, macrofagi, neutrofili, cellule epiteliali ed endoteliali. Ad oggi è chiaro che tali recettori non hanno un unico modo di agire, ma possiedono distinte funzioni a seconda del tipo cellulare e del tessuto sui cui sono espressi (14). I TLR sono caratterizzati dalla presenza di un dominio extracellulare LRR ricco in leucine e un dominio intracellulare TIR simile al recettore per l’interleuchina 1 (Fig. 2)

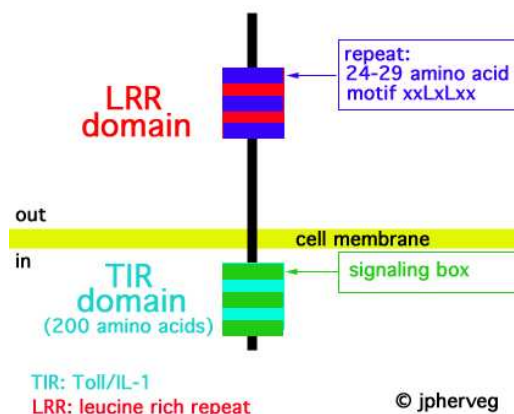


Fig. 2 Struttura TLR

Una volta attivati dai PAMPS (pathogen-associated molecular patterns), i TLR determinano a loro volta l'attivazione di MAPK e del fattore di trascrizione NF κ B che promuove la sintesi e il rilascio di mediatori solubili pro-infiammatori come l'IL-8 e di prodotti ad azione antimicrobica come la β -defensina 2 (HBD2) (15-16). La funzione principale dei TLR è quella di riconoscere e avviare la risposta ai microorganismi patogeni, ma recentemente è stato visto che tali recettori sono in grado di riconoscere ligandi endogeni, chiamati anche “segnali di danno”, quali cellule necrotiche, proteine Heat shock, frammenti di rottura della matrice extracellulare, radicali liberi che vengono rilasciati a seguito di un danno tissutale, infezione o necrosi cellulare (Fig. 3).

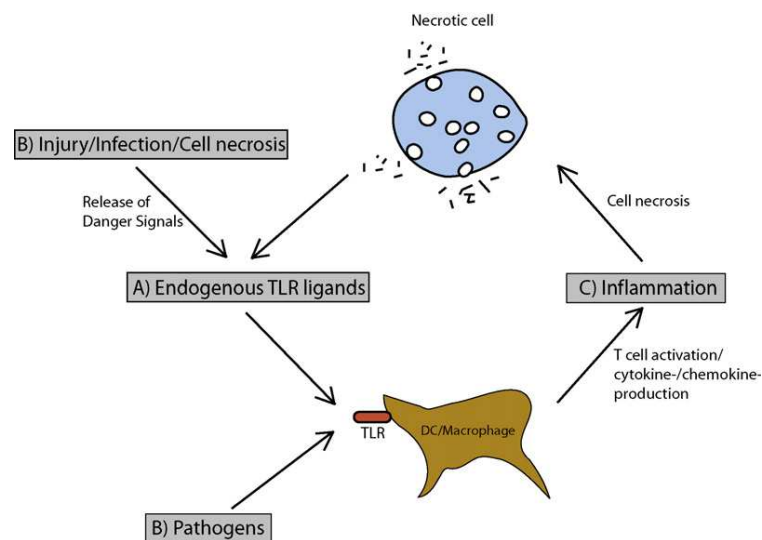


Fig. 3 Partecipazione dei TLR all'infiammazione

In particolare tra i TLR, il TLR4 che riconosce il lipopolisaccaride dei batteri Gram-negativi e il TLR2 che riconosce i componenti dei batteri Gram-positivi, rappresentano tra i più importanti e conosciuti recettori dell'immunità innata (17). Per quanto riguarda il TLR4, la risposta cellulare all'endotossina richiede la cooperazione di quattro proteine, ovvero LBP (LPS binding protein), CD14, MD2 e lo stesso TLR4. L'epitelio in condizioni normali esprime solo poche molecole di TLR4, in modo da mantenere una condizione di iporesponsività all'endotossina. L'esposizione a specifici batteri e la cooperazione tra LBP, CD14, MD2 a livello delle cellule epiteliali determina l'attivazione del pathway del TLR4 (18).

Il rilascio di HBD2, a seguito dell'attivazione del TLR4, contribuisce ad amplificare la risposta immunitaria innata agendo come ligando endogeno del TLR4 (19). Nella BPCO numerosi sono gli eventi che contribuiscono ad alterare le difese innate dell'ospite, quali l'aumento in circolo dei ROS (20) e l'*over-expression* di catepsine che causa un aumento della degradazione di HBD2 (21).

Tali eventi nel complesso possono contribuire a favorire le infezioni batteriche e le colonizzazioni che si osservano frequentemente nei pazienti con BPCO. L'infiammazione nel polmone persiste per anni dalla

cessazione dell'esposizione al fumo di sigaretta. Recenti evidenze inquadrano la BPCO come una possibile malattia autoimmune avviata dal fumo di sigaretta. A seguito del danno indotto ai tessuti il fumo di sigaretta determina la liberazione di prodotti che sono in grado di attivare il sistema immunitario innato (22) (Fig. 4).

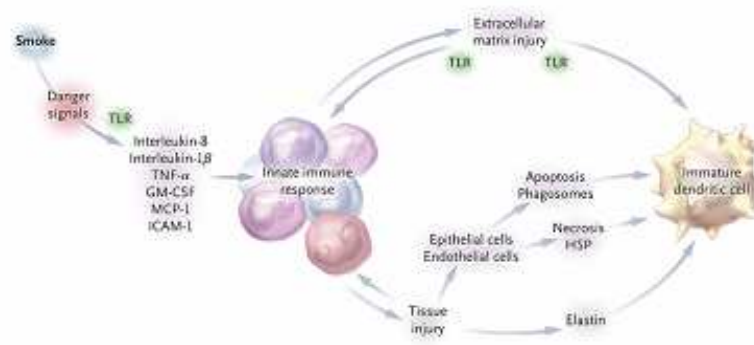


Fig. 4. Risposta iniziale al fumo di sigaretta

Dall'altro lato la presenza di ripetute infezioni delle vie aeree gioca un ruolo cruciale nella patogenesi della BPCO e nel declino delle funzioni respiratorie. Sebbene *in vitro* l'esposizione al fumo di sigaretta alteri l'espressione e l'attivazione del TLR4 in una linea di cellule epiteliali bronchiali (23), non è noto se tale fenomeno avvenga *in vivo*, se l'espressione sia differentemente alterata a vari livelli dell'albero bronchiale e se questa sia associata a un'alterata espressione di HBD2 e di markers proinfiammatori. E' probabile che nei pazienti con BPCO, a

livello epiteliale, l'attivazione dei TLR sia alterata e che vi sia un'attivazione preferenziale del pathway pro-infiammatorio piuttosto che quello difensivo. La ridotta produzione o attivazione di HBD2 può determinare una maggiore suscettibilità alle infezioni e colonizzazioni microbiche.

La terapia farmacologica della BPCO

La terapia farmacologica della BPCO ha l'obiettivo di prevenire e di controllare la sintomatologia, diminuire la frequenza e la gravità delle riacutizzazioni, migliorare le condizioni generali e la tolleranza all'esercizio fisico.

I farmaci attualmente indicati nella terapia della BPCO sono costituiti da:

- 1) broncodilatatori (farmaci β 2-agonisti selettivi, anticolinergici, metilxantine)
- 2) glucocorticoidi
- 3) farmaci di altro tipo (vaccini, antibiotici, terapia con α 1-antitripsina, mucolitici, antiossidanti, immunoregolatori ecc.)

Nessuna delle classi di farmaci attualmente impiegati nella BPCO è in grado di modificare la progressiva diminuzione della funzionalità respiratoria che caratterizza questa patologia (24). Attualmente soltanto la

sospensione dell'abitudine al fumo di sigaretta è in grado di ridurre la progressione della BPCO. Da qui l'esigenza di sviluppare nuove classi di farmaci che possano controllare il processo infiammatorio e distruttivo che caratterizza la BPCO. Negli ultimi anni gli studi si stanno concentrando su una nuova classe di farmaci: gli inibitori della fosfodiesterasi (PDE).

Il Cilomilast (CIL) appartiene alla classe degli inibitori delle fosfodiesterasi (PDE), enzimi responsabili dell'idrolisi dell'AMPc, in particolare delle PDE4. La PDE4 è l'isoenzima che principalmente è coinvolto nel metabolismo dell'AMPc nelle cellule infiammatorie del sistema immune, quali neutrofili, macrofagi, cellule T, cellule endoteliali. Le cellule epiteliali dell'apparto respiratorio esprimono prevalentemente la PDE4, mentre le altre fosfodiesterasi mostrano una minore attività (25). L'inibizione della PDE4, determina un incremento dei livelli di AMPc ed una riduzione dell'attivazione delle cellule infiammatorie delle vie respiratorie. L'AMPc è un secondo messaggero che sopprime l'attività di molte cellule infiammatorie e promuove il rilassamento della muscolatura liscia delle vie aeree, garantendo così un miglioramento dell'entità del restringimento delle vie aeree e dei danni dovuti all'infiammazione. Inibitori non selettivi delle fosfodiesterasi, quali la

teofillina e le metilxantine sono utilizzati nella gestione dei pazienti BPCO già da anni, tuttavia il loro uso è limitato a causa degli effetti collaterali associati all'utilizzo della teofillina come il vomito, nausea, mal di testa, nervosismo, disturbi gastrointestinali.

Inibitori selettivi delle PDE4 hanno mostrato proprietà anti-infiammatorie *in vitro* e *in vivo* (26) associate ad un miglioramento delle condizioni cliniche del paziente (27, 28). Lo sviluppo di inibitori selettivi delle PDE4 fornisce nuove speranze per la terapia dei pazienti BPCO, grazie agli effetti anti-infiammatori e broncodilatatori e alla presenza di un minor numero di effetti collaterali rispetto agli inibitori non selettivi. Inoltre gli inibitori della PDE4 hanno una minore variabilità farmacocinetica e un più basso potenziale di interazioni farmacologiche rispetto al teofillina che ne rende più facile l'utilizzazione (29).

La somministrazione del Cilomilast ha mostrato nei pazienti:

- riduzione della bronco-costrizione
- riduzione dell'infiammazione e quindi del successivo danno ai tessuti
- riduzione della tosse e della dispnea.

Il Cilomilast quindi determina un miglioramento dello stato ostruttivo e infiammatorio delle vie aeree e pertanto può rappresentare un nuovo

approccio nel trattamento farmacologico della BPCO. Tuttavia ad oggi non è noto se il Cilomilast è in grado di modulare la risposta delle cellule epiteliali bronchiali al fumo di sigaretta e all'endotossina batterica.

OBIETTIVI DELLA RICERCA

In questo studio il nostro obiettivo è stato quello di valutare :

- se nella BPCO un'attivazione cronica o a una carente risposta dell'immunità innata, potesse correlare con l'espressione rispettivamente di TLR4 e HBD2 sia a livello delle vie aeree centrali che distali;
- se fosse presente a livello dell'epitelio delle vie aeree un'alterazione dell'espressione genica di HBD2;
- se il Cilomilast potesse modulare la risposta infiammatoria delle cellule epiteliali respiratorie indotta dall'esposizione all'estratto di fumo di sigaretta (CSE) e all'endotossina batterica (LPS). A tal fine abbiamo studiato gli effetti del farmaco sull'espressione del TLR4, sul rilascio di citochine, sulla chemiotassi di cellule infiammatorie e sull'attivazione di fattori di trascrizione coinvolti nel pathway di segnalazione del TLR4.

MATERIALI E METODI

Caratteristiche dei pazienti

I campioni chirurgici, provenienti da pazienti operati di tumore polmonare presso la struttura ospedaliera ISMETT-Palermo, sono stati prelevati da aree del polmone indenni e lontane dal tumore. Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'ISMETTT (#149311-29/05/2006) e per ciascun paziente è stato ottenuto il consenso informato.

Per ciascun paziente è stato calcolato il numero di pacchi/anno = (numero di sigarette fumate al giorno x numero di anni di fumo)/20.

I campioni sono stati selezionati in accordo con i criteri del Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) e suddivisi in quattro gruppi:

- 1) fumatori sani (S) (> 15 pacchi/anno) (GOLD 0) (12 pazienti);
- 2) fumatori con BPCO (s-BPCO) (> 15 pacchi/anno) (GOLD1-2) (17 pazienti);
- 3) ex fumatori con BPCO (ex-BPCO) (> 15 pacchi/anno, hanno smesso di fumare da più di un anno) (ex GOLD1-2) (8 pazienti);
- 4) sani ex/non fumatori (C) (<5 pacchi/anno) (13 pazienti) (Controlli).

I pazienti BPCO sono stati classificati sulla base dei parametri preoperatori della funzionalità polmonare, valutata tramite esame

spirometrico, considerata la tecnica di misurazione della funzionalità respiratoria più diffusa e riproducibile (9). In particolare sono stati presi in considerazione i parametri spirometrici: FEV1 (volume espiratorio forzato in 1 sec) e l'indice di Tiffeneau indicato come FEV1/FVC (capacità vitale forzata in 1 secondo). I pazienti BPCO mostravano un valore di FEV1 <80% o un indice FEV1/FVC <70% ed un effetto indotto da un farmaco broncodilatatore (salbutamolo) inferiore al 12%. I pazienti non erano sottoposti a terapia corticosteroidica inalatoria o sistemica né a terapia antibiotica e non erano andati incontro ad esacerbazioni durante il mese precedente lo studio. Inoltre i pazienti risultavano negativi allo skin prik test per i comuni allergeni e non presentavano storia di asma o rinite allergica.

Per ciascun paziente sono state utilizzate sezioni di biopsie bronchiali e di parenchima polmonare.

Immunoistochimica

Le vie aeree sono state classificate in centrali e distali in base alla lunghezza del perimetro della membrana basale, rispettivamente con un perimetro interno > 6 mm e ≤ 6 mm (30). Le sezioni sono state dapprima deparaffinate, immergendo i vetrini in xylene, reidratate in soluzioni

d'etanolo a concentrazione decrescente (100%; 80%; 50%), quindi immersi in TBS per 10 min.

Per consentire un miglior riconoscimento dell'antigene da parte dell'anticorpo le sezioni sono state incubate a 95°C in una soluzione alcalina a pH 9, per 45 min., cui ha fatto seguito una fase di Blocking in BSA 0,5% in TBS, per evitare binding aspecifici e l'incubazione con gli anticorpi: anti-TLR4 (Santa Cruz), anti-HBD2 (Santa Cruz) 1:10, O.N. a 4°C; il controllo negativo è stato preparato incubando la sezione con immunoglobuline di rabbit (Dako). Al termine si è passati alla fase di sviluppo in fosfatasi alcalina (Dako), la contro-colorazione in ematossilina e il montaggio dei vetrini in glicerolo.

Quantizzazione della colorazione

La quantizzazione della colorazione è stata effettuata contando al microscopio ottico le cellule epiteliali che sono risultate positive alla colorazione mentre la misurazione della membrana basale è stata effettuata all'analizzatore d'immagini tramite il programma Leica Application Suite V3. La positività per HBD2 è espressa dal rapporto: n° cellule epiteliali positive/lunghezza in mm di membrana basale.

Microdissezione laser

La microdissezione laser (LMD) è stata effettuata utilizzando il microdissettore Leica AS LMD (Leica Microsystems, Germany) (31). Frammenti di tessuto polmonare dell'albero bronchiale di soggetti s-BPCO ed ex-BPCO sono stati immersi in Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europa BV, Zoeterwoude, The Netherlands), raffreddati in isopentano e congelati rapidamente in azoto liquido prima della conservazione a -80°C . Quindi sono stati tagliati al criostato in sezioni di $5\text{ }\mu\text{m}$ che sono state fissate su appositi vetrini Membrane Slides (Leica, Germany), pretrattati ai raggi UV per 20 min. I vetrini sono stati dapprima posti in etanolo freddo 70% per 1 minuto e poi sottoposti ad una rapida colorazione (10 secondi) attraverso passaggi in acqua RNase-free, soluzione di ematossilina di Mayer, acqua e per finire in etanolo al 95% e al 100%. Le cellule epiteliali, riconosciute dalle loro caratteristiche morfologiche, sono state microdisseccate, raccolte in un tubo eppendorf e processate.

Real time PCR

La Real time PCR è stata effettuata come precedentemente descritto (32). L'estrazione di RNA totale dai tessuti microdisseccati dei soggetti s-

BPCO ed ex-BPCO e dalle cellule 16HBE trattate con IL-1 e CSE, è stata effettuata utilizzando RNAeasy Microkit (Qiagen, Milan, Italy). Per la retrotrascrizione, è stato utilizzato il kit Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La Real time PCR per il gene umano HBD2, è stata effettuata utilizzando ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e specifici probe FAM-labeled e primers (Applied Biosystems, TaqMan Assays on Demand). L'espressione del gene per GAPDH è stata utilizzata come controllo endogeno per la normalizzazione. La quantizzazione relativa di mRNA è stata effettuata col metodo comparativo CT (Cycle Threshold).

Preparazione dell'estratto di fumo di sigaretta (CSE)

Per lo studio *in vitro* sono state utilizzate sigarette (Marlboro). L'estratto di fumo di sigaretta è stato preparato come descritto in precedenza (23). L'estratto di una sigaretta è stato solubilizzato in 25 ml di PBS, la soluzione ottenuta è stata filtrata attraverso un filtro di 0.22 μm e successivamente diluita per essere utilizzata in ciascun esperimento. La concentrazione di CSE è stata determinata allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 320 nm. Poichè la media delle densità ottiche osservate per l'estratto preparato da una sigaretta era di 1.37 ± 0.16 , le

variazioni di concentrazione sono state considerate trascurabili. La concentrazione di CSE utilizzata nei diversi esperimenti era pari al 10% del volume finale utilizzato per ogni saggio.

Trattamento delle cellule epiteliali bronchiali 16HBE

Per lo studio *in vitro*, sono state utilizzate le 16HBE (*Human Bronchial Epithelial cell line*), una linea di cellule epiteliali bronchiali umane immortalizzate con SV40.

Le 16HBE sono state mantenute in MEM (Gibco, BRL, Germany), addizionato con 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco), 0.5 % gentamicin (Gibco), 1% glutammina (Gibco), 2,5% Hepes (Gibco), 1% MEM (aminoacidi non essenziali) (Gibco) (23). Le colture cellulari sono state mantenute in atmosfera umidificata al 5% CO₂ e alla temperatura di 37°C. Le cellule sono state trattate con IL1 (30 ng/ml) (R&D System , Minneapolis, MN), endotossina batterica (LPS 1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), estratto di fumo di sigaretta (CSE 10%) e Cilomilast (1µM, 10µM) (GlaxoSmithKline) per 18 ore per i saggi di Citofluorimetria, Real Time PCR e Chip assay, per 3h e 20 min per l'analisi rispettivamente dei fattori di trascrizione IKBα ed ERK1/2. Al

termine del trattamento si è proceduto alla lisi delle cellule e l'estratto è stato sottoposto a saggi di Real Time PCR, Western-blot e CHIP assay.

Citofluorimetria

Per le analisi citofluorimetriche è stato utilizzato il citofluorimetro Becton Dickinson FACSCalibur. Sono stati acquisiti 10.000 eventi per campione e l'analisi è stata fatta utilizzando il programma cellQuest (Becton Dickinson BD). Per la valutazione della HBD2 intracellulare, le 16HBE furono fatte crescere O.N. in presenza di GolgiStop (2 μ M) (BD PharMingen). Furono quindi lavate due volte con PBS contenente 1% di FCS e fissate con PBS1X al 4% paraformaldehide per 20 min a temperatura ambiente. Al termine furono effettuati lavaggi con soluzione permeabilizzante (PBS contenente 1% FCS, 0.3% saponin, e 0.1% Na azide) e quindi incubate in successione, prima con un anticorpo primario policlonale rabbit anti-HBD2 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) e poi con un anticorpo secondario fluorescente anti-rabbit IgG FITC (Dako). Per il controllo negativo sono state utilizzate immunoglobuline di rabbit (BD PharMingen). Per la valutazione del TLR4 le cellule sono state incubate al buio (30 min, 4°C) con PE anti-human TLR4 monoclonal mouse antibody (eBioscience San Diego CA), per il controllo negativo sono state utilizzate immunoglobuline di mouse (Dako). Al termine i

campioni furono letti al citofluorimetro. I risultati sono espressi o come percentuale di cellule positive o come intensità media di fluorescenza (MFI). Ogni saggio è stato replicato per 5 volte.

Western Blot

La valutazione dell'espressione di p-IkB α , t-IkB α , p-ERK1/2, t-ERK1/2, è stata effettuata tramite western blot. E' stato utilizzato un gel di poliacrilammide al 10% e sono state caricate 40 μ g di proteine totali. Alla corsa elettroforetica è seguito il trasferimento su membrana, il blocking (5% No Fat Dry Milk in PBS-T) e l'incubazione con gli specifici anticorpi primari: anticorpo policlonale di rabbit anti-p-IkB α (1:500) (Cell Signaling Technology Inc), anticorpo policlonale di rabbit anti-t-IkB α (1:1000) (Cell Signaling Technology Inc), anticorpo policlonale di rabbit anti-p-ERK 1/2 (1:500) (Cell Signaling Technology Inc), anticorpo policlonale di rabbit anti-t-ERK1/2 (1:500) (Cell Signaling Technology Inc), anticorpo policlonale mouse anti- β -actina (1:10000) (SigmaAldrich). Al termine le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-rabbit HRP (1:10000) (SigmaAldrich), o anti-mouse HRP (1:1000) (SigmaAldrich). La rivelazione è stata effettuata tramite sistema in chemiluminescenza ECL (GE Healthcare,

Chalfont St. Giles, UK) e successiva esposizione della lastra fotografica. Le immagini relative sono state acquisite allo scanner EPSON GT-6000 e la quantizzazione della densità delle bande è stata fatta utilizzando il programma Health Image analysis 1.61. I dati sono stati espressi come rapporto dell'intensità della banda della proteina fosforilata o totale verso la corrispondente β -actina, utilizzata come proteina housekeeping.

Chip assay

Il Chip assay è stato effettuato seguendo le specifiche istruzioni del kit EZ-Chip kit (Upstate-Millipore Corporate-Billerica, MA). A seguito del trattamento per 18h con IL1 (30 ng/ml), CSE (10%), le cellule 16HBE sono state fissate in paraformaldeide al 37% e lisate, l'estratto ottenuto fu sonicato in modo da ottenere dei frammenti di cromatina della lunghezza di 200-1000 bp. I campioni sono stati quindi immunoprecipitati utilizzando un anticorpo anti-human NF κ B e gli immunocomplessi di DNA e proteine, precipitati utilizzando la Proteina AG agarose. Quindi il DNA è stato purificato utilizzando le colonnine fornite dal kit. Il DNA isolato è stato amplificato mediante PCR, utilizzando i primer verso la regione promotrice del gene HBD2, che presenta il sito di legame per NF κ B. I primer utilizzati sono stati:

forward 5'-GGTGTGAATGGAAGGAACTCA-3', reverse 5'-TTCAGCTCCTGGGGATGATAC-3' (33).

Chemiotassi dei neutrofili e linfociti

I neutrofili e i linfociti sono stati isolati da sangue periferico di soggetti donatori sani (34, 35).

La chemiotassi dei neutrofili e dei linfociti è stata effettuata tramite micro chamber (Costar Neuro Probe Inc) come descritto in precedenza (34, 35).

Come stimoli chemiotattici sono stati utilizzati i mezzi condizionati (MC) delle cellule 16HBE trattate con CSE (10%), LPS (1µg/ml), Cilomilast (1µM) per 18h e come controllo sono state utilizzate aliquote del solo mezzo di coltura al quale sono stati addizionati e mantenuti per 18h il CSE, LPS, Cilomilast. Al microscopio ottico sono state contate il numero di cellule migrate (5 campi per pozzetto). Ogni saggio è stato replicato per 5 volte.

ELISA

I mezzi condizionati (MC) delle cellule 16HBE trattate con CSE (10%), LPS (1µg/ml), Cilomilast (1µM) per 18h, sono stati utilizzati per dosare l'IL-8 e l'IP-10. Sono stati utilizzati kit commerciali seguendo le istruzioni allegate. Per il dosaggio dell'IL-8 è stato utilizzato il kit ELISA

IL-8 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) (sensibilità < 5 pg/ml), per il dosaggio dell'IP-10 è stato utilizzato il kit ELISA IP-10 (Quantikine R&D Systems, Minneapolis, MN) (sensibilità = 1,67 pg/ml).

Statistica

I dati relativi allo studio *ex-vivo* sono stati espressi come mediane \pm deviazione standard. I test Kruskal Wallis e Mann Whitney sono stati utilizzati per confrontare i dati relativi ai vari gruppi di pazienti. I dati relativi ottenuti dallo studio *in vitro* sono stati valutati con analisi della varianza (ANOVA). $P < 0.05$ è stato accettato come significativo dal punto di vista statistico. Lo Spearman-test è stato utilizzato per le correlazioni.

RISULTATI

Caratteristiche demografiche dei pazienti

Le caratteristiche demografiche dei pazienti e i valori della funzionalità respiratoria dei gruppi di pazienti studiati sono mostrati nella Tab. 3. Tutti i pazienti dei vari gruppi hanno età simile. Il numero pacchi/anno è più elevato nei fumatori BPCO che negli ex-fumatori BPCO ($p<0.01$).

	Controlli=13	Fumatori sani=12	s-BPCO=17	ex-BPCO=8
Genere (M/F)	9/4	10/2	15/2	7/1
Età (anni) Means±SD	60±13	63±9	64±8	70±7
Pacchi/anno	-	59±21	70±31 *	40±24
FEV1 % del teorico Means±SD	89±16	77±12	68±15	78±8
FEV1/FVC % del teorico Means Means±SD	83± 6	80 ±9	60± 7	65± 4

* $p<0.01$ vs ex-BPCO

Tab.3 Caratteristiche demografiche dei pazienti

Espressione di TLR4 nell'epitelio delle vie aeree distali e centrali

Dati della letteratura mostravano che il fumo di sigaretta interferiva con la risposta immunitaria innata dell'epitelio respiratorio (36) per cui abbiamo voluto valutare l'espressione dei TLR4 nelle cellule epiteliali delle vie aeree distali e centrali dei soggetti controllo (C), fumatori sani (S), fumatori con BPCO (s-BPCO), ex fumatori con BPCO (ex-BPCO). L'espressione del TLR4 è aumentata nell'epitelio delle vie aeree distali, nei fumatori, nei fumatori BPCO e negli ex-fumatori BPCO rispetto ai soggetti controllo (Fig. 5 A). Nell'epitelio delle vie aeree centrali l'espressione del TLR4 risulta aumentata nei fumatori sani e nei fumatori BPCO rispetto ai soggetti controllo e l'espressione del TLR4 è più elevata nei fumatori sani rispetto ai fumatori BPCO (Fig. 5 A'). Sia le cellule epiteliali basali che colonnari esprimono il TLR4.

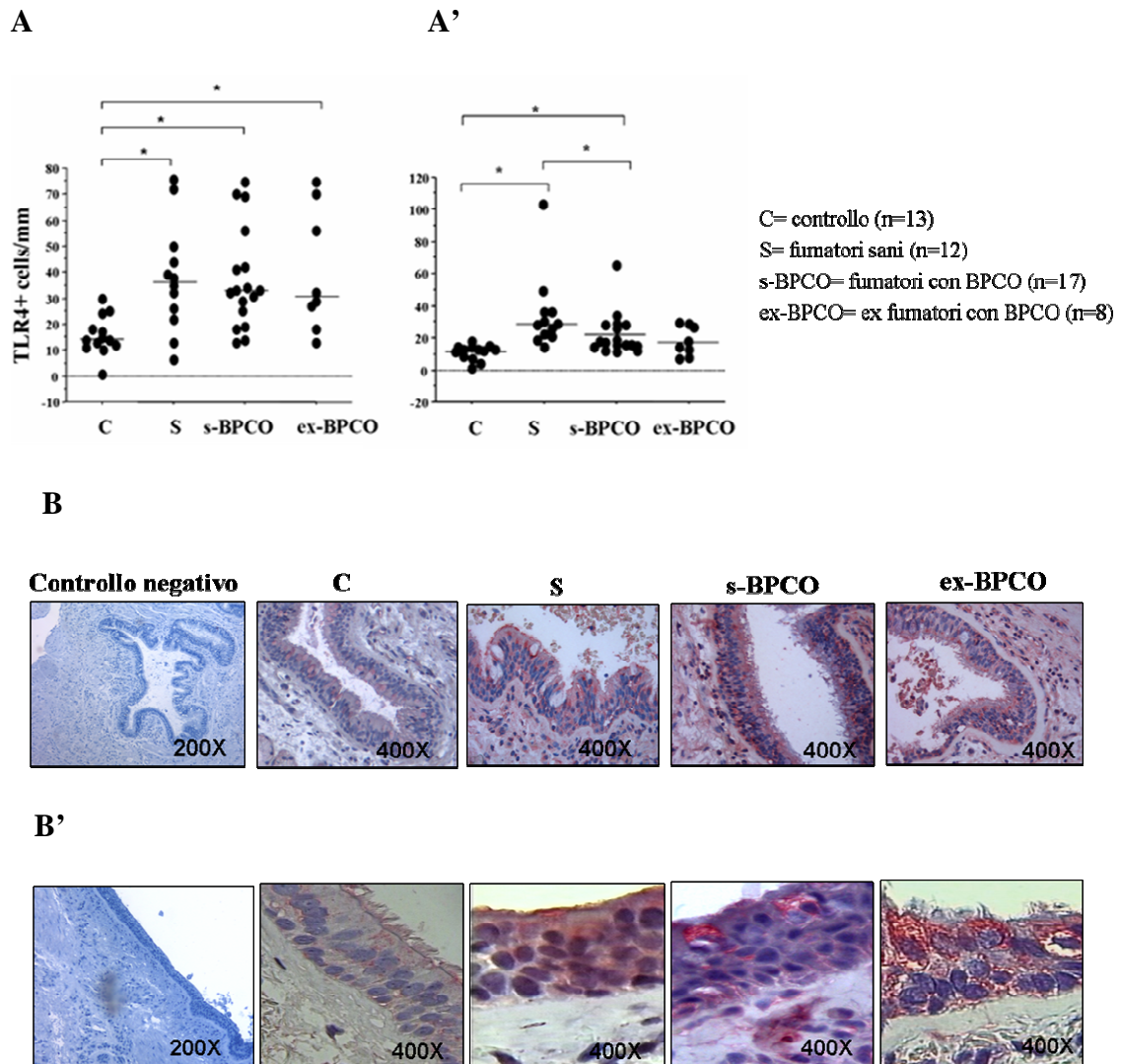


Fig. 5 Espressione di TLR4 nell'epitelio delle vie aeree distali e centrali. Valutazione tramite immunoistochimica dell'espressione di TLR4 nell'epitelio delle vie aeree distali (A) e centrali (A'). La positività per TLR4 è espressa dal rapporto: n° cellule epiteliali positive/lunghezza in mm di membrana basale. Ogni punto è rappresentativo del valore di positività calcolato per ogni paziente, la barra orizzontale rappresenta il valore della mediana. * $p < 0.05$ calcolato con Mann-Whitney U test. Per ogni gruppo di pazienti è stata scelta un'immagine rappresentativa l'espressione di TLR4 a livello epiteliale delle vie aeree distali (B) e centrali (B'). L'espressione di TLR4 è visibile come colorazione rossa, ad un ingrandimento 400X. Il controllo negativo (200X) è stato preparato incubando la sezione con immunoglobuline di rabbit (Dako).

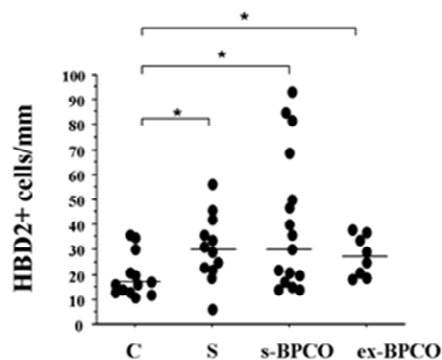
Espressione di HBD2 nell'epitelio delle vie aeree centrali e distali

I risultati precedentemente presentati hanno mostrato un'incrementata espressione del TLR4 nell'epitelio respiratorio di soggetti con BPCO. Poichè l'attivazione della risposta immunitaria innata determina il rilascio di defensine (37), peptidi ad azione antimicrobica, abbiamo valutato l'espressione dell'HBD2 nell'epitelio respiratorio di fumatori con BPCO (s-BPCO), ex fumatori con BPCO (ex-BPCO), fumatori sani (S) e controllo (C). L'espressione di HBD2 è stata valutata per immunoistochimica su sezioni di biopsie bronchiali e di parenchima polmonare a livello dell'epitelio delle vie aeree distali e centrali.

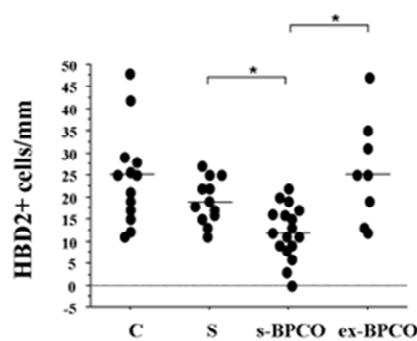
Abbiamo osservato che nell'epitelio delle vie aeree distali dei soggetti fumatori con BPCO (s-BPCO), ex fumatori con BPCO (ex-BPCO) e fumatori sani (S) l'espressione dell'HBD2 è aumentata rispetto ai soggetti controllo (C) (Fig. 6 A).

Nell'epitelio delle vie aeree centrali, l'espressione di HBD2 è significativamente ridotta nei fumatori con BPCO rispetto ai soggetti fumatori sani e agli ex-fumatori con BPCO (Fig. 6 A').

A

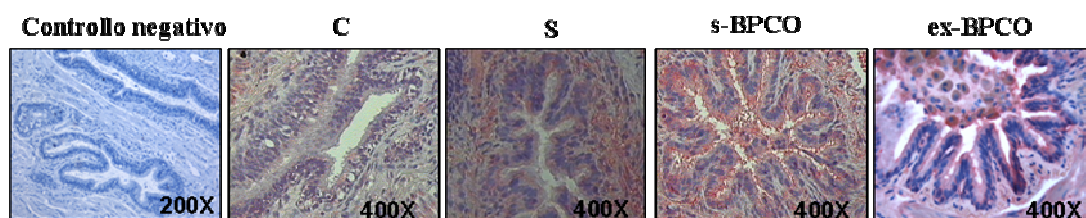


A'



C= controllo (n=13)
 S= fumatori sani (n=12)
 s-BPCO= fumatori con BPCO (n=17)
 ex-BPCO= ex fumatori con BPCO (n=8)

B



B'

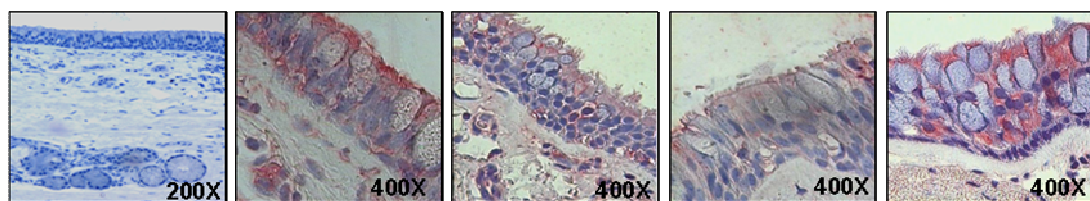


Fig. 6 Espressione di HBD2 nell'epitelio delle vie aeree distali e centrali. Valutazione tramite immunoistochimica dell'espressione di HBD2 nell'epitelio delle vie aeree distali (A) e centrali (A'). La positività per HBD2 è espressa dal rapporto: n° cellule epiteliali positive/lunghezza in mm di membrana basale. Ogni punto è rappresentativo del valore di positività calcolato per ogni paziente, la barra orizzontale rappresenta il valore della mediana. * $p < 0.05$ calcolato con Mann-Whitney U test. Per ogni gruppo di pazienti è stata scelta un'immagine rappresentativa l'espressione di HBD2 a livello epiteliale delle vie aeree distali (B) e centrali (B'). L'espressione di HBD2 è visibile come colorazione rossa, ad un ingrandimento 400X. Il controllo negativo (200X) è stato preparato incubando la sezione con immunoglobuline di rabbit (Dako).

Abbiamo valutato se l'espressione del TLR4 e HBD2 nelle vie aeree distali e centrali potesse correlare con i parametri spirometrici presi in considerazione o con l'esposizione al fumo di sigaretta. Nessuna correlazione significativa è stata evidenziata tra questi parametri e l'espressione del TLR4, mentre abbiamo trovato una significativa correlazione tra l'espressione di HBD2 nelle vie aeree centrali di tutti i pazienti in esame e l'indice di Tiffeneau (Spearman correlation; $\rho=0.5$; $p=0.0001$), (Fig. 7 A) un parametro spirometrico rappresentativo della limitazione del flusso aereo (33), ma non tra l'espressione di HBD2 e FVC. Inoltre abbiamo messo in evidenza come l'espressione di HBD2 nelle vie aeree centrali correli inversamente con l'esposizione al fumo di sigaretta espressa in termini di numero di pacchi/anno (Spearman correlation; $\rho=0.5$; $p<0.003$) (Fig. 7 B).

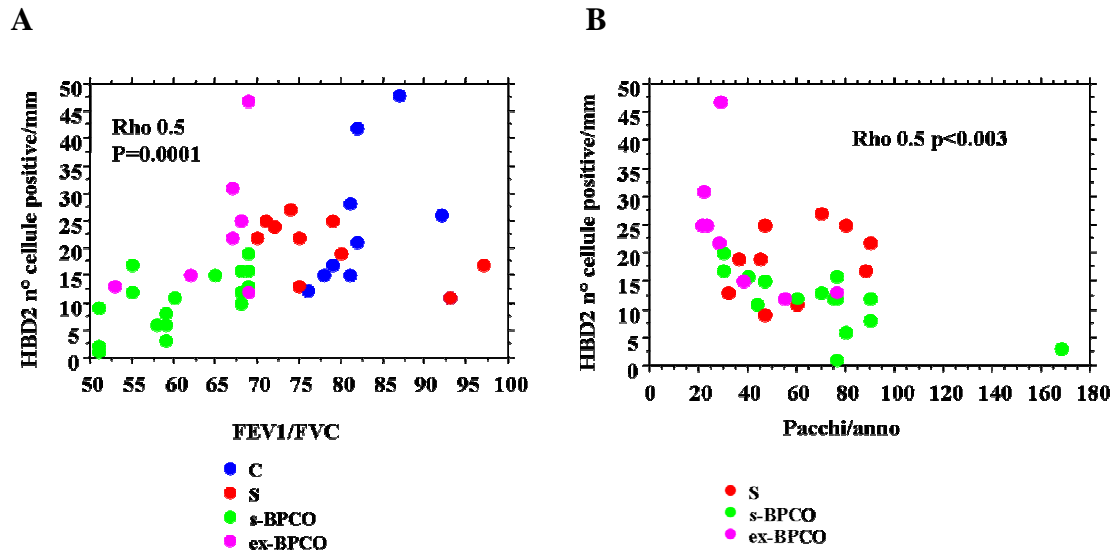


Fig. 7 Correlazione tra l'espressione di HBD2 nelle vie aeree centrali e i parametri: FEV1/FVC e numero pacchi/anno. (A) Correlazione tra l'espressione di HBD2 nell'epitelio delle vie aeree centrali, espressa dal rapporto: n° cellule epiteliali positive/lunghezza in mm di membrana basale e l'indice di Tiffeneau (FEV1/FVC) (Spearman correlation; rho=0.5; p=0.0001); (B) Correlazione inversa tra l'espressione di HBD2 nell'epitelio delle vie aeree centrali e numero di pacchi/anno (Spearman correlation; rho=0.5; p<0.003).

Espressione di mRNA per HBD2 nell'epitelio bronchiale microdissecato

Per comprendere se una ridotta espressione di mRNA fosse responsabile della diversa espressione di HBD2 tra i fumatori (s-BPCO) e gli ex fumatori con BPCO (ex-BPCO) nelle vie aeree centrali, è stata effettuata la Real time PCR su RNA isolato dall'epitelio bronchiale microdissecato dei due gruppi di pazienti. Abbiamo osservato una riduzione

dell'espressione di mRNA per HBD2 nel gruppo dei fumatori con BPCO (s-BPCO) rispetto agli ex-BPCO (Fig. 8).

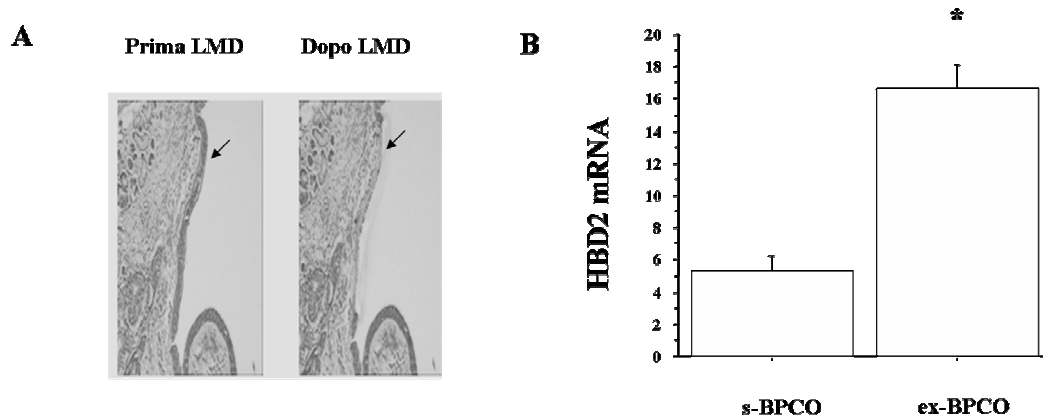


Fig. 8 Espressione di mRNA per HBD2 dell'epitelio bronchiale microdissecato. (A) Epitelio bronchiale prima (a sinistra) e dopo (a destra) la microdissezione laser. (B) Espressione di mRNA per HBD2 valutata tramite Real time PCR su RNA isolato dall'epitelio bronchiale microdissecato di 3 pazienti s-BPCO e di 3 pazienti ex-BPCO. L'espressione del gene GAPDH è stata utilizzata come controllo endogeno. (media \pm SD). * $p < 0.05$.

Effetti in vitro dell'estratto di fumo di sigaretta sulle cellule epiteliali bronchiali

Per meglio comprendere il ruolo del fumo di sigaretta, abbiamo valutato l'espressione di HBD2 in cellule epiteliali bronchiali (16HBE) trattate con IL1 (30 ng/ml) e CSE (10%), sia in termini di mRNA che di proteina (Fig. 9 A, 9 B). I nostri risultati mostrano che il CSE non modifica

l'espressione costitutiva di HBD2 a differenza dell'incremento indotto dall'IL1. Nel trattamento combinato il CSE contrasta significativamente l'effetto mediato da IL1. Infine, abbiamo studiato i meccanismi alla base degli effetti inibitori del CSE sull'induzione dell'espressione di HBD2. A tale scopo abbiamo valutato l'espressione di p-IKB α e di t-IKB α . Il trattamento con IL1 delle cellule epiteliali bronchiali, a differenza del solo CSE, incrementa l'espressione di p-IKB α con conseguente aumento dell'attivazione del pathway di NF κ B; nel trattamento combinato il CSE interferisce negativamente con tale fenomeno. L'espressione di IKB α totale non è modificata da nessun trattamento (Fig. 9 C). La tecnica del CHIP assay, ci ha consentito di mettere in evidenza il legame tra la regione promotrice del gene per HBD2 e il fattore di trascrizione NF κ B (Fig. 9 D). L'unica banda di amplificazione che si osserva è quella corrispondente al trattamento delle cellule epiteliali bronchiali con IL1 (lane 4), ciò indica che IL1 determina il legame di NF κ B alla regione promotrice di HBD2 e che questo effetto viene contrastato quando trattiamo le cellule con il CSE (lane 3, 5).

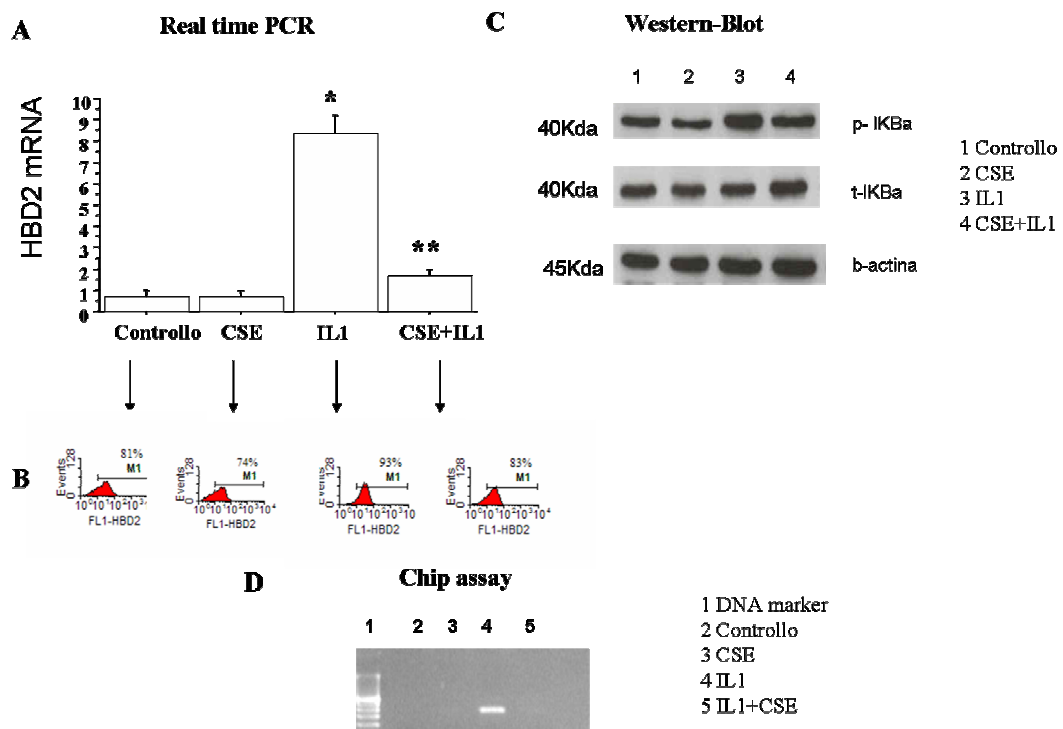


Fig. 9 Effetti dell'estratto di fumo di sigaretta (CSE) sulle cellule epiteliali bronchiali (16HBE). (A) Real time PCR per HBD2 sulle 16HBE trattate per 18 h con IL1 (30 ng/ml) e CSE (10%) da soli e in combinazione. L'espressione del gene per GAPDH è stata utilizzata come controllo endogeno (mean±SD). * $p < 0.05$ vs controllo ** $p < 0.05$ vs IL1. (B) Analisi citofluorimetrica dell'espressione di HBD2 in cellule 16HBE. L'espressione di HBD2 è espressa come percentuale di cellule positive per HBD2. (C) Espressione di p-IkB α o t-IkB α su cellule 16HBE trattate con IL1 e CSE da soli e in combinazione per 3h. (D) Chip assay sulle cellule 16HBE trattate con IL1 e CSE, da soli e in combinazione. Sono stati utilizzati primer diretti verso i siti di legame di NF-KB nella regione promotrice di HBD2.

Effetti del Cilomilast sull'espressione del TLR4

Poiché il trattamento combinato con CSE e LPS è in grado di aumentare l'espressione del TLR4 (23) abbiamo voluto indagare se il trattamento in combinazione con il Cilomilast fosse in grado di modificare la risposta delle 16HBE agli stimoli infiammatori. I risultati hanno mostrato che il Cilomilast è in grado di contrastare gli effetti del CSE e LPS sulle cellule epiteliali bronchiali relativamente l'espressione del TLR4, infatti il trattamento combinato delle 16HBE con Cilomilast, CSE e LPS, determina una riduzione dell'espressione del TLR4 sia in termini di percentuale di cellule TLR4 positive che in termini d'intensità media di fluorescenza (MFI) (Fig.10 A, B). Le cellule stimulate col diluente (DIL) (etanolo) in cui è stato sciolto il farmaco, mostrano un'espressione del TLR4 simile ai livelli basali (dati non mostrati).

In questo esperimento il farmaco è stato utilizzato a due concentrazioni differenti (1 μ M, 10 μ M), le cellule trattate col Cilomilast mostrano un'espressione del TLR4 non significativamente diversa dai livelli basali, mentre in presenza di CSE e LPS entrambe le dosi di Cilomilast determinano una riduzione significativa dell'espressione del TLR4. Pertanto negli esperimenti successivi è stata utilizzata la dose di farmaco più bassa, pari a 1 μ M.

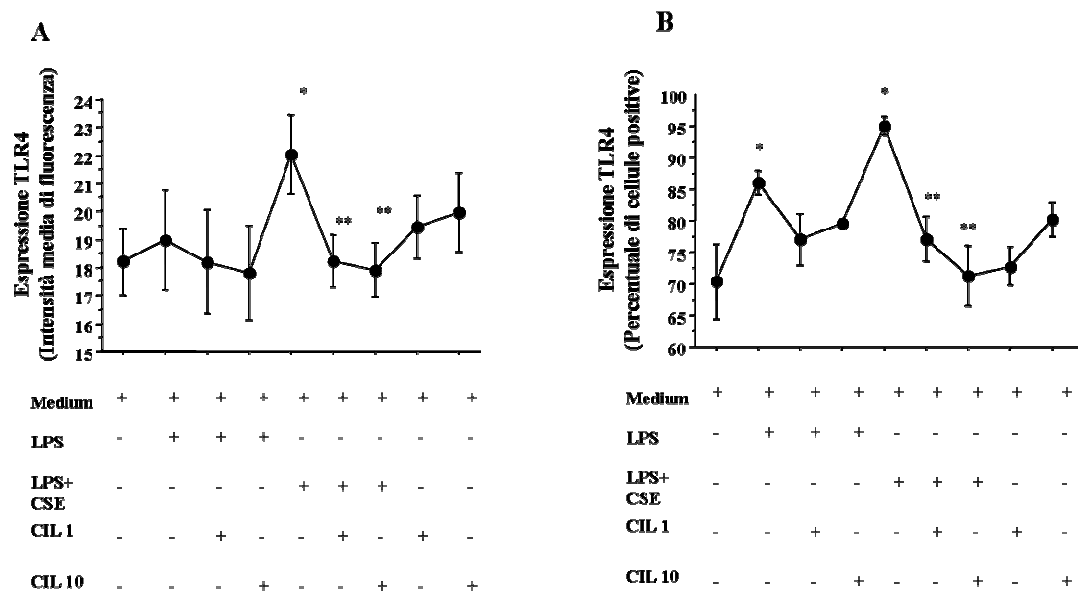


Fig. 10 Effetti del Cilomilast sull'espressione del TLR4. Le cellule 16HBE sono state trattate con LPS (1µg/ml), CSE (10%), Cilomilast (1µM, 10 µM) per 18h. L'espressione del TLR4 è stata valutata al citofluorimetro. (A) Espressione TLR4 sulle 16HBE valutata come intensità media di fluorescenza (MFI) (Media±SD); (B) espressione TLR4 sulle 16HBE valutata come percentuale di cellule positive (Media±SD). * p<0.05 vs medium, ** p<0.05 vs CSE+LPS.

Effetti del Cilomilast sul rilascio di IL-8 ed IP-10

Il CSE è in grado d'incrementare il rilascio di IL-8 dalle cellule epiteliali bronchiali stimulate con LPS, mentre dall'altro lato determina un riduzione del rilascio di IP-10 (23).

Il Cilomilast è in grado di contrastare gli effetti del CSE e dell'LPS, infatti è in grado di ridurre significativamente il rilascio di IL-8 nelle

16HBE stimulate con CSE e LPS (Fig.11 A), mentre è in grado d'incrementare il rilascio di IP-10 (Fig.11 B).

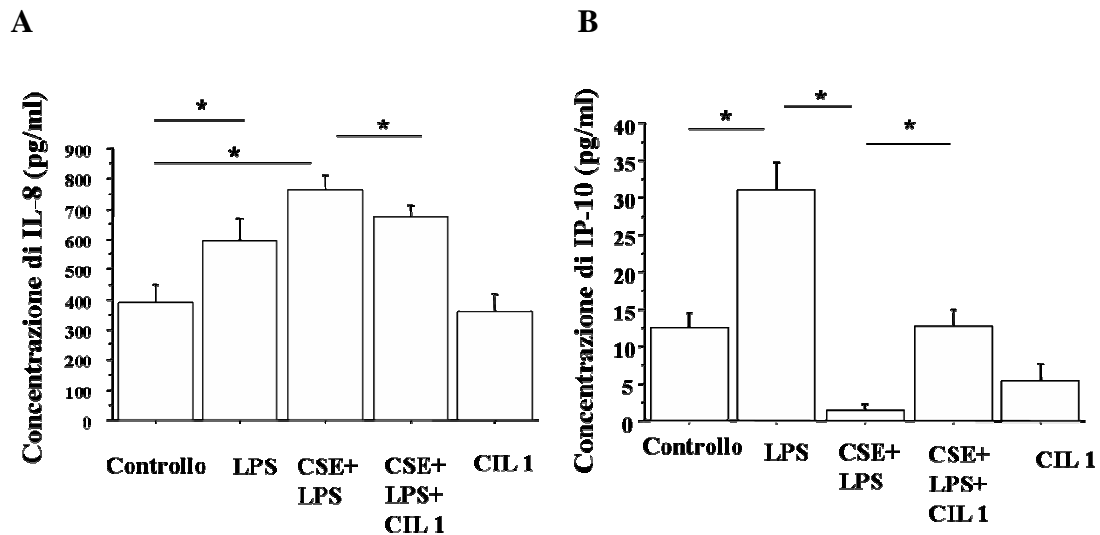


Fig. 11 Effetti del Cilomilast sul rilascio di IL-8 e IP-10 dalle cellule epiteliali bronchiali (16HBE). Le 16HBE sono state trattate con LPS (1 μ g/ml), CSE (10%), Cilomilast (1 μ M) per 18 h. L'IL-8 (A) e l'IP-10 (B) presenti nei mezzi condizionati sono stati dosati tramite ELISA. I dati sono espressi come medie \pm SD, * $p < 0.05$.

Effetti del Cilomilast sulla chemiotassi dei neutrofili

Dal momento che il Cilomilast è in grado di ridurre il rilascio di IL-8 e considerando che i mezzi condizionati (MC) delle 16HBE stimulate con CSE e LPS sono in grado d'incrementare la chemiotassi dei neutrofili (23), abbiamo voluto valutare gli effetti del Cilomilast sulla chemiotassi dei neutrofili. MC ottenuti dalle 16HBE stimulate con LPS determinano

un aumento della chemiotassi dei neutrofili che viene ulteriormente incrementata in seguito alla stimolazione con CSE (23). MC delle 16HBE stimulate con CSE e LPS in presenza di Cilomilast mostrano una significativa diminuzione dell'attività chemiotattica rispetto la condizione con CSE e LPS (Fig. 12).

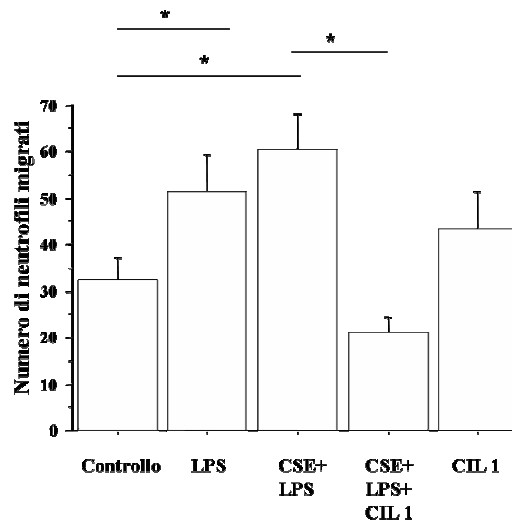


Fig. 12 Chemiotassi dei Neutrofili. Le cellule 16HBE sono state trattate con CSE (10%), LPS(1µg/ml), Cilomilast (1µM) da soli e in combinazione per 18h. I mezzi condizionati raccolti sono stati utilizzati come stimoli per indurre la chemiotassi dei neutrofili. Al microscopio ottico sono state contate il numero di cellule migrate di ogni pozzetto, per ciascuna condizione sperimentale. *p<0.05.

Effetti del Cilomilast sulla chemiotassi dei linfociti

L'IP-10 è una citochina che induce la chemiotassi dei linfociti. In uno studio precedente (23), è stato dimostrato che i mezzi condizionati (MC) di 16HBE stimulate con CSE e LPS, mostravano una ridotta

concentrazione di IP-10 e determinavano una riduzione della chemiotassi dei linfociti. Considerando che il Cilomilast è in grado d'incrementare il rilascio di IP-10 dalle 16HBE stimulate con CSE e LPS, abbiamo voluto valutare se il farmaco fosse in grado di modificare la chemiotassi dei linfociti. MC di 16HBE stimulate col farmaco in presenza di CSE e LPS, determinano un incremento significativo della chemiotassi dei linfociti, contrastando in parte l'effetto determinato dal CSE (Fig. 13).

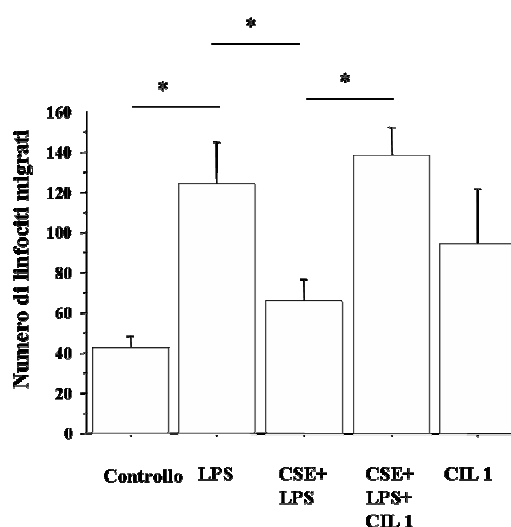


Fig. 13 Chemiotassi dei Linfociti. Le cellule 16HBE sono state trattate con CSE (10%), LPS (1 µg/ml), Cilomilast (1 µM) da soli e in combinazione per 18h. I mezzi condizionati raccolti sono stati utilizzati come stimoli per indurre la chemiotassi dei linfociti. Al microscopio ottico sono state contate il numero di cellule migrate di ogni pozzetto, per ciascuna condizione sperimentale. *p<0.05.

Effetti del Cilomilast sul pathway di NF κ B ed ERK

Studi precedenti hanno messo in evidenza che la stimolazione delle 16HBE con CSE e LPS determina l'attivazione del pathway di ERK piuttosto che quello di NF κ B (23) pertanto abbiamo voluto valutare l'effetto del Cilomilast sull'attivazione dei due pathway. Per determinare l'effetto del Cilomilast sul pathway di NF κ B, è stata valutata la fosforilazione di I κ B α (inibitore di NF κ B). In seguito alla stimolazione delle 16HBE con LPS si osserva un aumento significativo della fosforilazione di I κ B α rispetto i livelli basali. La stimolazione delle 16 HBE con CSE e LPS determina una diminuzione della fosforilazione di I κ B α rispetto al solo LPS, l'aggiunta del Cilomilast è in grado d'incrementare significativamente l'attivazione di tale pathway determinando un incremento della fosforilazione di I κ B α (Fig. 14).

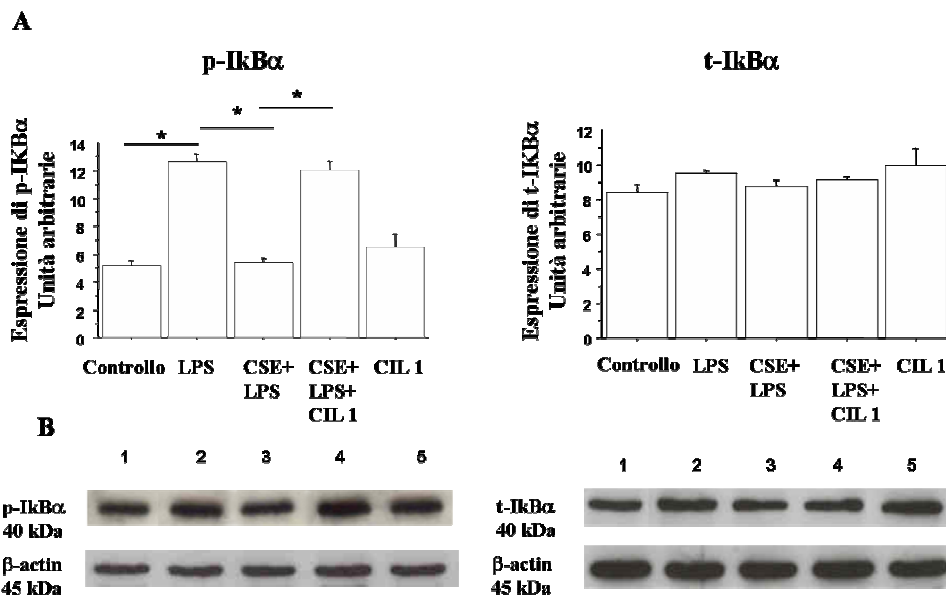


Fig. 14 Espressione di IKBα nelle cellule 16HBE. Le 16HBE sono state trattate con CSE (10%), LPS (1μg/ml), Cilomilast (1μM), da soli e in combinazione per 3h. (A) Analisi densitometrica dell'espressione di p-IKBα e t-IKBα tramite Health Image analysis 1.61. I dati sono stati espressi come rapporto dell'intensità della banda della proteina fosforilata o totale vs la β-actina *p<0.05. (B) Western-blot. Lane 1 Controllo, lane 2 LPS, lane 3 CSE+LPS, lane 4 CSE+LPS+CIL 1 μM, lane 5 CIL 1 μM.

Il Cilomilast non è in grado di modificare significativamente l'espressione di t-IKBα. Il rapporto p-IKBα/t-IKBα aumenta quando le cellule sono stimulate con LPS, e tale incremento è significativamente ridotto quando le cellule sono stimulate anche col CSE. L'aggiunta del Cilomilast alle cellule stimulate con CSE ed LPS aumenta significativamente il rapporto p-IKBα/t-IKBα (Tab. 4 A).

Le 16HBE stimulate con LPS e CSE mostrano un aumento dell'espressione di p-ERK1/2 e di t-ERK1/2 (Fig.15) rispetto la condizione basale. L'aggiunta del Cilomilast in presenza di CSE e LPS è in grado di ridurre significativamente sia p-ERK1/2 che t-ERK1/2. Nessuna differenza significativa sul pathway di attivazione di ERK è stata osservata tra la condizione stimolata con LPS e quella con CSE e LPS. Il rapporto p-ERK/t-ERK aumenta significativamente quando le cellule sono stimulate con LPS, con CSE e LPS e con CIL (Tab. 4 B). L'aggiunta del Cilomilast non influenza significativamente il rapporto p-ERK/t-ERK se paragonato alla condizione con CSE e LPS.

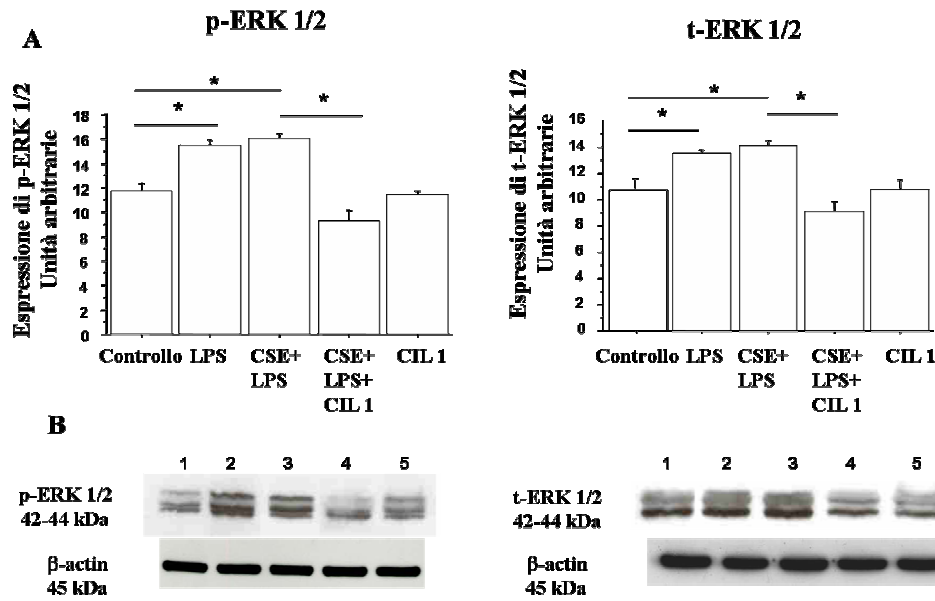


Fig. 15 Espressione di ERK1/2 nelle cellule 16HBE. Le 16HBE sono state trattate con CSE (10%), LPS (1µg/ml), Cilomilast (1µM), da soli e in combinazione per 20 min. (A) Analisi densitometrica dell'espressione di p-ERK1/2 e t-ERK1/2 tramite Health Image analysis 1.61. I dati sono stati espressi come rapporto dell'intensità della banda della proteina fosforilata o totale vs la β-actina *p<0.05. (B) Western-blot. Lane1 Controllo, lane 2 LPS, lane 3 CSE+LPS, lane 4 CSE+LPS+CIL 1 µM, lane 5 CIL 1 µM.

A**pIKB/tIKB ratio**

	Mean±SD	P value
Controllo	0.62±0.11	
LPS	1.32±0.07	* <0.02; **<0.03
LPS+CSE	0.6±0.13	* ns
LPS+CSE+CIL1	1.3±0.08	** <0.01
CIL1	0.66±0.2	*n.s.

B**pERK/tERK ratio**

	Mean± SD	P value
Controllo	0.71±0.06	
LPS	1.14±0.07	* <0.05
LPS+CSE	1.135±0.05	* <0.05
LPS+CSE+CIL1	1.05±0.38	** n.s.
CIL1	1.068±0.102	* <0.05

Tab. 4 Analisi densitometrica del rapporto tra l'espressione di p-IKB α e t-IKB α (A), p-ERK1/2 e t-ERK1/2 (B). Le 16HBE sono state trattate con CSE (10%), LPS (1 μ g/ml), Cilomilast (1 μ M), da soli e in combinazione, analisi densitometrica tramite Health Image analysis 1.61, i dati sono stati espressi come medie \pm SD del rapporto dell'intensità della banda della proteina fosforilata vs la proteina totale. *vs Controllo
** vs LPS+CSE

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'epitelio respiratorio partecipa attivamente alle risposte dell'immunità innata. Nella patogenesi della BPCO un'alterazione dell'immunità innata, potrebbe contribuire al declino della funzione respiratoria. L'obiettivo di questo studio è stato quello di: I) valutare se la BPCO fosse associata ad una insufficiente risposta o ad una eccessiva attivazione dei meccanismi dell'immunità innata; II) valutare il ruolo svolto dall'epitelio respiratorio, poiché le alterazioni determinate dal processo infiammatorio nell'epitelio delle vie aeree distali e prossimali sono differenti; III) valutare l'azione di un farmaco, il Cilomilast e la sua capacità di modificare la risposta infiammatoria delle cellule epiteliali respiratorie indotta dall'esposizione all'estratto di fumo di sigaretta (CSE) e all'endotossina batterica (LPS).

I processi infiammatori che interessano l'epitelio delle vie aeree centrali, determinano produzione di muco a causa dell'ipertrofia ghiandolare e tutti quei cambiamenti strutturali che sono associati alla bronchite cronica (38).

I processi infiammatori che interessano le vie aeree distali, determinano occlusione del lume bronchiale a causa della produzione di essudati

contenenti muco, ispessimento della parete e restringimento del lume bronchiale (39).

Sulla base di tali considerazioni una prima parte dello studio è stata effettuata utilizzando un modello *ex- vivo*, con l'obiettivo di valutare se la BPCO fosse associata ad una insufficiente risposta o ad una eccessiva attivazione dei meccanismi dell'immunità innata e indagare sul ruolo svolto dall'epitelio respiratorio. Una seconda parte dello studio è stata effettuata utilizzando un modello *in vitro* di cellule epiteliali bronchiali trattate con un farmaco, il Cilomilast, in presenza di estratto di fumo di sigaretta e l'endotossina batterica, per studiare la capacità del composto di modificare la risposta dell'epitelio respiratorio all'insulto infiammatorio.

- Nella prima parte dello studio è stata valutata l'espressione del TLR4 e di HBD2 a livello delle vie aeree centrale e distali di diversi gruppi di pazienti divisi in fumatori con BPCO, ex fumatori con BPCO, fumatori sani e soggetti controllo.

La risposta immunitaria innata si realizza grazie al riconoscimento da parte dei TLR di componenti strutturali comuni a molti microrganismi, o a ligandi endogeni quali proteine Heat shock. Studi precedenti hanno

dimostrato che l'espressione di alcuni TLR risultava modificata nei pazienti con BPCO, in particolare è stato osservato che l'espressione del TLR2 è incrementata nei monociti isolati da sangue periferico di soggetti con BPCO (40) e che macrofagi alveolari di pazienti BPCO e fumatori mostrano una ridotta espressione del TLR2 rispetto ai soggetti che non hanno mai fumato (41).

In questo studio per la prima volta abbiamo dimostrato che le cellule epiteliali sia a livello delle vie aeree centrali che distali esprimono il TLR4 e l'espressione di tale recettore è incrementata nell'epitelio di entrambi i distretti sia nei fumatori sani che nei fumatori con BPCO. L'incrementata espressione del TLR4 correla con i risultati precedentemente pubblicati che mostrano un aumento dell'espressione del TLR4 nelle cellule epiteliali bronchiali stimulate con l'estratto di fumo di sigaretta (CSE) (23).

L'aumentata espressione di TLR4 potrebbe tradursi in un'aumentata attivazione delle risposte immunitarie innate, con una conseguente amplificazione dei processi infiammatori già innescati dall'esposizione al fumo di sigaretta. L'attivazione dei TLR è anche finalizzata al rilascio di peptidi ad azione antimicrobica come la beta-defensina 2 (HBD2) (42), inoltre è stato dimostrato che le cellule epiteliali respiratorie richiedono il

TLR4 per il rilascio di HBD2 a seguito stimolazione con LPS (43). Per indagare la presenza, nei fumatori con BPCO o nei fumatori sani di uno squilibrio esistente tra le risposte difensive e proinfiammatorie dell'immunità innata, abbiamo valutato l'espressione di HBD2.

La HBD2 è principalmente presente nelle cellule strutturali epiteliali ed esercita specifica attività chemiotattica verso i neutrofili (44), inoltre può amplificare le risposte mediate dal TLR4 agendo come suo ligando endogeno (45). In questo studio abbiamo dimostrato che l'espressione di HBD2 è ridotta nell'epitelio delle vie aeree centrali di fumatori con BPCO rispetto ai fumatori sani e agli ex-fumatori con BPCO, tale espressione correla col grado di ostruzione delle vie aeree, valutato come riduzione del rapporto FEV1/FVC, ritenuto un parametro spirometrico rappresentativo della limitazione del flusso aereo (46).

L'espressione di HBD2 nelle vie aeree centrali, inoltre correla inversamente con l'esposizione al fumo di sigaretta espressa in termini di pacchi/anno, ciò suggerisce fortemente che l'esposizione al fumo di sigaretta influenza in modo sostanziale l'espressione di HBD2 nei paziente BPCO. Confrontando i due diversi fenotipi BPCO, si osserva che il messaggero per HBD2 risulta meno espresso a livello dell'epitelio delle vie aeree dei s-BPCO rispetto gli ex-BPCO e per supportare

ulteriormente tale evidenza, abbiamo condotto degli esperimenti *in vitro*. Abbiamo osservato che l'esposizione delle cellule epiteliali bronchiali all'estratto di fumo di sigaretta, riduce l'espressione di HBD2, sia a livello di messaggero che di proteina, indotta dall'IL1, una citochina che ha un ruolo cruciale nel processo infiammatorio della BPCO. Il fumo di sigaretta interferisce con la risposta immunitaria innata incrementando la produzione di muco, riducendo la clearance mucociliare, distruggendo la barriera epiteliale e stimolando la migrazione di cellule infiammatorie (47). Inoltre l'esposizione al fumo di sigaretta blocca l'attivazione del pathway di NFκB indotta da LPS (23), tale pathway ha un ruolo cruciale nella sintesi di HBD2. A supporto di tali dati, abbiamo dimostrato che il CSE inibisce l'attivazione del pathway di NFκB indotta da IL1 e interferisce negativamente nel legame di NFκB alla regione promotrice del gene per HBD2. E' stato visto che soggetti con un ridotto numero di copie del gene per HBD2 sono predisposti al morbo di Crohn (48); allora una ridotta espressione di HBD2 nelle vie aeree centrali nei fumatori con BPCO, che abbiamo evidenziato nel nostro studio, potrebbe supportare ulteriormente l'ipotesi che una deregolazione dell'espressione di HBD2 in uno specifico compartimento dell'albero bronchiale possa contribuire allo sviluppo della malattia. Ulteriori meccanismi potrebbero spiegare la

riduzione di HBD2 nelle vie aeree centrali di soggetti fumatori con BPCO. La sintesi di HBD2 può essere promossa dalla leptina (49) e nelle cellule epiteliali delle biopsie bronchiali, l'espressione della leptina e del suo recettore è ridotta nei pazienti con BPCO medio-severo (50).

Dal momento che non tutti i fumatori sviluppano la BPCO (51), la ridotta espressione di HBD2 nelle vie aeree centrali potrebbe identificare i soggetti fumatori predisposti a sviluppare la BPCO. Ulteriori studi sono necessari per validare tale ipotesi. Comunque una riduzione nell'espressione di HBD2 associata ad un incremento dell'espressione del TLR4 nelle vie aeree centrali potrebbe suggerire un'alterazione nell'attivazione della risposta immunitaria innata che a tale livello può favorire a sua volta l'invasione microbica a livello delle vie aeree distali e del parenchima (52).

In condizioni fisiologiche, le vie aeree distali sono sterili, mentre nei pazienti con BPCO sono cronicamente colonizzate da potenziali patogeni respiratori (52). La colonizzazione batterica cronica stimola il sistema immune dell'ospite e causa un'infiammazione cronica delle vie aeree (53), che a sua volta promuove il danno tissutale che si osserva nei pazienti con BPCO. L'infiammazione a livello bronchiolare correla col peggioramento funzionale che precede l'enfisema (54). L'incremento

dell'espressione sia del TLR4 che di HBD2 nelle vie aeree distali di pazienti con BPCO correla con un'incrementata attivazione della risposta immunitaria innata. A livello delle vie aeree distali di fumatori con BPCO e con insufficienza respiratoria acuta si osserva un'incrementata espressione di HBD2 che si associa ad un'aumentata sopravvivenza dei neutrofili (53), ciò determina un'amplificazione della risposta infiammatoria che si associa all'occlusione del lume bronchiale. Gli ex fumatori con BPCO mostrano un'incrementata espressione di HBD2 a livello dell'epitelio delle vie aeree centrali e ciò supporta ulteriormente l'ipotesi che la cessazione dell'abitudine al fumo di sigaretta può alterare il profilo infiammatorio delle cellule epiteliali delle vie aeree, in questo caso si ha un recupero dell'espressione di HBD2 che risulta sostanzialmente ridotta nelle vie aeree centrali dei fumatori con BPCO. Gli ex fumatori con BPCO mostrano meno metaplasia squamosa, cellule epiteliali proliferanti e una riduzione di goblet cell rispetto ai fumatori con BPCO (55).

In conclusione attraverso questa prima parte dello studio abbiamo dimostrato che sebbene una *over-expression* del TLR4 è presente nelle vie aeree centrali e distali di fumatori BPCO e fumatori sani, l'espressione di HBD2 è ridotta solo nelle vie aeree centrali ma non in

quelle distali dei fumatori BPCO. Tale risultato correla col grado di ostruzione e con la storia di fumo, suggerendo così un'alterazione della risposta immunitaria innata che può favorire l'invasione microbica e associato danno tissutale che si osserva nei pazienti con BPCO

- La seconda parte dello studio è stata condotta su un modello *in vitro* di cellule epiteliali bronchiali, trattate con estratto di fumo di sigaretta (CSE) e endotossina batterica (LPS). La scelta di questi due stimoli è giustificata dal fatto che la BPCO è principalmente causata dal fumo di sigaretta, ma allo stesso tempo, ricorrenti infezioni delle vie aeree hanno un ruolo cruciale nella progressione della malattia e nel declino della funzione respiratoria. A tale scopo è stato proposto *in vitro* un modello sperimentale che mima la condizione di un soggetto fumatore esposto allo stesso tempo a prodotti microbici. Su questo modello abbiamo voluto valutare l'azione di un farmaco, il Cilomilast (CIL), sulla risposta infiammatoria delle cellule epiteliali bronchiali a seguito dell'esposizione al CSE e LPS.

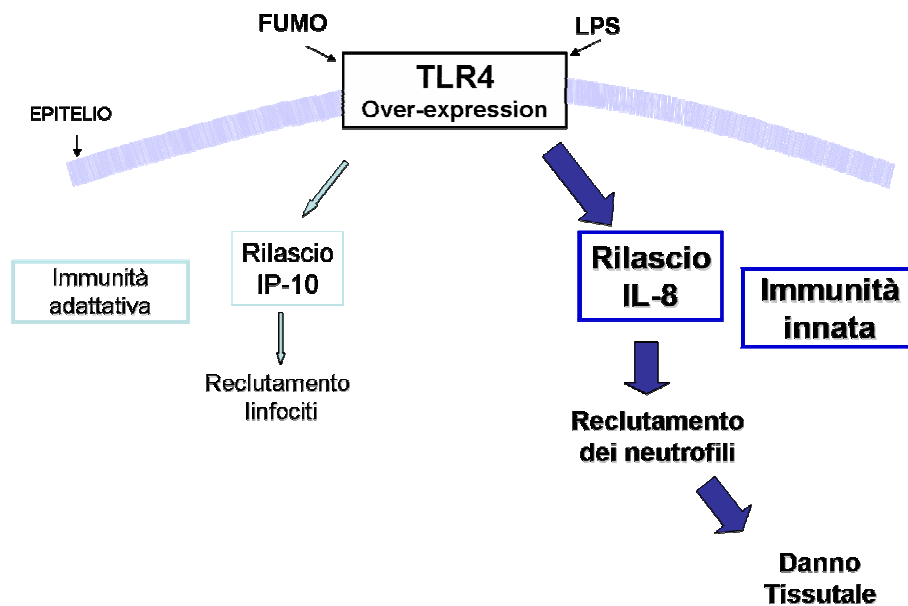
Il CIL è un inibitore delle PDE4, considerate un possibile target per lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento della BPCO. Differentemente dagli steroidi che hanno una limitata efficacia anti-infiammatoria, è stata

ampiamente documentata un'elevata attività anti-infiammatoria degli inibitori delle PDE4 in modelli animali di BPCO esposti al fumo di sigaretta (56). Il trattamento dei pazienti con BPCO con inibitori delle PDE4 è associato ad una riduzione dei linfociti CD8+ e delle cellule CD68+ (57). Gli effetti anti-infiammatori determinati da tale farmaco sono associati ad un miglioramento del quadro clinico del paziente, associato ad una riduzione della frequenza delle esacerbazioni ed un miglioramento del parametro FEV1 prima e dopo la somministrazione di un broncodilatatore (27, 28). Negli ultimi anni si sta sviluppando il concetto "d'immunità contigua", caratterizzata dalla stretta inter-comunicazione tra i pathway dell'immunità innata ed adattativa.

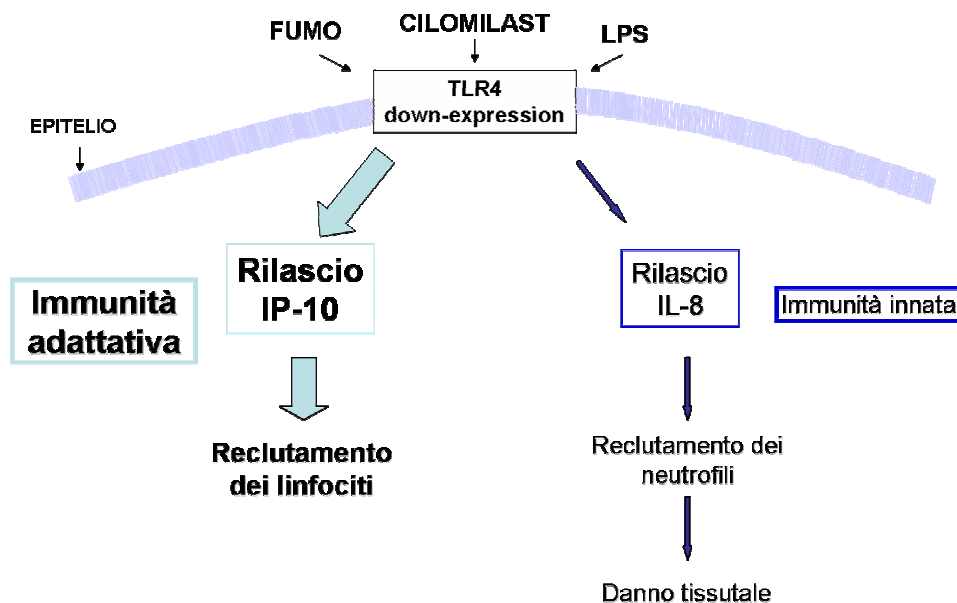
In condizioni fisiologiche il legame dell'endotossina batterica (LPS) al TLR4, determina l'attivazione del recettore stesso e dei pathway molecolari intracellulari ad esso correlati. A seguito dell'attivazione del TLR4 si ha il rilascio di peptidi ad azione antimicrobica e di citochine infiammatorie, tra queste l'IL-8 che avvia la risposta immunitaria innata e l'IP-10 che avvia in un secondo momento la risposta immunitaria adattativa. L'IL-8 e l'IP-10 sono due mediatori entrambi associati all'infiammazione cronica delle vie aeree, ma che hanno diversi ruoli fisiopatologici. L'IL-8 è una citochina che determina prevalentemente la

chemiotassi dei neutrofili, cellule coinvolte in prima linea nella risposta immunitaria innata, mentre l'IP-10 è chemoattrattante per i linfociti ed i monociti coinvolti nella risposta immunitaria adattativa, inoltre mentre l'IL-8 è pro-angiogenetico e pro-fibrotico, l'IP-10 è angiostatico e anti-fibrotico. In condizioni fisiologiche un equilibrio nel rilascio di citochine coinvolte differentemente nell'immunità innata ed adattativa e con diversa attività biologica consente il mantenimento dell'omeostasi. Nelle cellule epiteliali bronchiali il trattamento con l'estratto di fumo di sigaretta altera la fisiologica risposta della cellula all'endotossina, ligando naturale del TLR4, determinando un'ulteriore incremento dell'espressione del TLR4 che si associa ad un ulteriore rilascio di IL-8 e ad una riduzione nel rilascio di IP-10 (23).

Livelli elevati di IL-8, giustificano l'accumulo dei neutrofili a livello delle vie aeree ed il conseguente quadro infiammatorio caratteristico della BPCO, dall'altro lato ridotti livelli di IP-10 compromettono il richiamo dei linfociti, il cui ruolo è quello di innescare l'immunità adattativa e limitare l'invasione microbica e gli effetti dannosi correlati ad una prolungata persistenza dei neutrofili (23). Nelle cellule epiteliali bronchiali stimulate con CSE e LPS, si viene così a creare uno squilibrio nel rilascio di citochine che promuove il protrarsi dell'infiammazione.



In questo studio abbiamo dimostrato che il CIL è in grado di contrastare gli effetti del CSE relativamente l'espressione e l'attivazione del TLR4 sulle cellule epiteliali bronchiali stimulate con LPS. Il trattamento combinato delle cellule epiteliali bronchiali con CSE e LPS determina un incremento nell'espressione del TLR4 (23). Il CIL è in grado di contrastare gli effetti del CSE e dell'LPS relativamente l'espressione del TLR4, infatti in presenza di CIL l'espressione del TLR4 sulle 16HBE trattate con CSE ed LPS viene riportata a livelli basali.



L'aggiunta del CIL alle cellule epiteliali bronchiali trattate con il CSE e LPS in associazione, induce una *down-espressione* del TLR4 che determina una riduzione nel rilascio di IL-8 cui consegue una riduzione dell'attività chemiotattica dei neutrofili, allo stesso tempo un incremento del rilascio di IP-10 cui si associa un incremento dell'attività chemiotattica dei linfociti. Il CIL ripristina la fisiologica attivazione del TLR4 ricreando un equilibrio nel rilascio di citochine con differente attività biologica, spostando l'equilibrio a favore della risposta immunitaria adattativa. Il CIL è in grado d'inibire alcuni aspetti della risposta infiammatoria che il CSE e LPS innescano sulle cellule epiteliali bronchiali. Il CSE in associazione all'endotossina determina sulle cellule epiteliali una riduzione nel rilascio di IP-10, interferendo con

l'attivazione di segnali che sono primariamente coinvolti nell'espressione di IP-10, quali il pathway di NF κ B (23, 58). Il trattamento combinato delle cellule epiteliali bronchiali con il CSE e LPS, non determina l'attivazione di NF κ B ma causa l'attivazione di ERK1/2 promuovendo un aumento del rilascio di IL-8 e una riduzione del rilascio di IP-10 (23). In questo studio abbiamo dimostrato che il CIL in presenza di CSE e LPS, attiva il pathway di NF κ B, dal momento che è aumentata la fosforilazione di I κ B- α e il rapporto p-I κ B α /t-I κ B α . Le cellule 16HBE trattate con CIL, in presenza di CSE e LPS, mostrano una riduzione dei livelli di p-ERK1/2, rispetto il trattamento combinato con CSE e LPS. Sia l'estratto di fumo di sigaretta che l'endotossina batterica determinano un incremento nel rilascio di IL-8 e della chemiotassi dei neutrofili, dall'altro lato determinano la riduzione del rilascio di IP-10 e della chemiotassi dei linfociti (23). Il CIL è in grado di contrastare gli effetti dell'estratto di fumo di sigaretta sulle cellule epiteliali bronchiali trattate con LPS, incrementando l'attività chemiotattica dei linfociti e riducendo quella dei neutrofili. Quest'ultimo risultato è in accordo con precedenti risultati che mostravano la capacità del CIL di contrastare l'incremento dei neutrofili indotto dal CSE e LPS in modo dose-dipendente (59). Il nostro modello sperimentale ci ha consentito di valutare gli effetti del

CIL sia sulla chemiotassi dei linfociti che dei neutrofili e di dimostrare che tale farmaco è in grado di modificare il reclutamento di neutrofili e linfociti, ripristinando un equilibrio tra risposta immunitaria innata ed adattativa, caratteristica peculiare dell'immunità contigua. L'immunità contigua ha un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi del polmone. Una risposta eccessiva del sistema immunitario adattativo a livello polmonare può determinare il protrarsi dello stato infiammatorio (60).

Questo studio fornisce evidenze convincenti che gli inibitori PDE4, oltre ad esplicare effetti inibitori sulle cellule infiammatorie delle vie aeree, possono inibire alcuni processi infiammatori determinati dall'esposizione diretta del fumo di sigaretta sulle cellule epiteliali delle vie aeree.

Tali dati supportano i risultati ottenuti nei trials clinici di fase II / III che suggeriscono un beneficio terapeutico degli inibitori PDE4 nella BPCO. In particolare è stato osservato che il roflumilast, un inibitore selettivo delle PDE4, somministrato a pazienti con BPCO severa, determina una riduzione della frequenza delle esacerbazioni infettive della malattia, migliorandone la funzionalità polmonare (61). I risultati ottenuti potrebbero aprire nuove prospettive per l'utilizzo del Cilomilast in nuovi trials clinici su pazienti con BPCO.

In conclusione possiamo affermare che l'epitelio respiratorio pur essendo una delle porte d'ingresso dei patogeni non rappresenta una barriera statica ma partecipa attivamente alla risposta immunitaria attraverso i meccanismi di difesa dell'immunità innata. I risultati da noi ottenuti hanno messo in evidenza il ruolo svolto dall'epitelio respiratorio nella BPCO. Abbiamo dimostrato che nei soggetti fumatori con BPCO, a livello dell'epitelio delle vie aeree centrali, si ha un'incrementata espressione del TLR4 che associata ad una ridotta espressione di HBD2 potrebbe favorire l'invasione microbica a livello delle vie aeree distali del parenchima, determinando una colonizzazione batterica cronica responsabile del danno tissutale che si osserva nei pazienti con BPCO. I nostri risultati *in vitro* ottenuti utilizzando un modello sperimentale che mima la condizione di un soggetto fumatore esposto allo stesso tempo a agenti microbici, hanno dimostrato la capacità di un farmaco, il Cilomilast, di contrastare gli effetti del CSE mediati da un'alterata espressione e attivazione del TLR4 sulle cellule epiteliali bronchiali. Il farmaco è in grado di modulare la risposta infiammatoria delle cellule epiteliali bronchiali indotta dall'esposizione all'estratto di fumo di sigaretta (CSE) e all'endotossina batterica (LPS), ripristinando la

fisiologica attivazione del TLR4 e ricreando un equilibrio nel rilascio di citochine con differente attività biologica.

BIBLIOGRAFIA

1. Cosio, M.G. and Majo J. "*Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells*" Chest 2002. 121 (5 Suppl): p. 160S-165S.
2. Pettersen, C.A. and Adler K.B. "*Airways inflammation and COPD: epithelial-neutrophil interactions*" Chest 2002. 121 (5 Suppl): p. 142S-150S.
3. Amato G. "*Malattie Allergiche Respiratorie e Broncopneumopatia Cronico Ostruttiva*" 2006 Mediserve
4. www.goldcopd.it
5. Romagnoli M., Fabbri L. "*Broncopneumopatia cronica ostruttiva: definizione e classificazione di gravità*" Ann. Ist. Super. Sanità 2003; 39 (4): 461-466.
6. MacNee W. "*Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*" Proc Am Thorac Soc 2005; 2: 258-266.
7. Morjaria J.B., Malerba M., Polosa R. "*Biologic and pharmacologic therapies in clinical development for the inflammatory response in COPD*" Drug Discov Today 2010 May; 15 (9-10): 396-405.
8. Schleimer R. "*Innate immune responses and chronic obstructive pulmonary disease. Terminator "or "Terminator 2"?*" Proc Am Thorac Soc 2005; 2: 342-346.
9. Wilson R. "*Bacteria, antibiotics and COPD*". Eur Respir J 2001; 17 (5): 995-1007.

10. Sethi S. and Murphy T.F. "*Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review*" Clin Microbiol Rev 2001; 14 (2): 336-63.
11. Bals R., Hiemstra P.S. "*Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens*" Eur Respir J 2004; 23: 327-333.
12. Diamone G., Legarda D., Ryan L.K. "*The innate immune response of the respiratory epithelium*" Immunological Review 2000; Vol.173: 27-38
13. Aderem A. and Ulevitch R.J. "*Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*" Nature 2000; 406 (6797): 782-7.
14. Drexler S.K., Foxwell B.M. "*The toll-like receptors in chronic inflammation*" The International Journal of Biochemistry&Cell Biology 42 (2010); 506-518.
15. Biragyn A., Ruffini P.A., Leifer C.A., Klyushnenkova E., Shakhov A., Chertov O., Shirakawa A.K., Farber J.M., Segal D.M., Oppenheim J.J., Kwak L.W. "*Toll like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by b-defensin 2*" Science 2002; 298: 1025-1029.
16. MacRedmond R., Greene C., Taggart C.C., McElvaney N., and O'Neill S. "*Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of Human β -defensin 2 by Lipopolysaccharide*" Respir Res 2005; 6: 116.
17. Dziarski R. and Gupta D. "*Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes*" J Endotoxin Res 2000; 6 (5): 401-5.

18. Martin T.R., Frevert C.W. "*Innate Immunity in the lung*" Proc Am Thorac Soc 2005; 2: 403-411.
19. Beg A.A. "*Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses*" Trends in Immunology 2002; 23 (11): 509-512.
20. Flaherty D.M., Monick M.M., Hinde S.L. "*Human alveolar macrophages are deficient in PTEN. The role of endogenous oxidants*" J Biol Chem 2006; 281: 5058-5064.
21. Taggart C.C., Greene C.M., Smith S.G., Levine R.L., McCray P.B. Jr, O'Neill S., McElvaney N.G. "*Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins*" J Immunol 2003; 171: 931-937.
22. Cosio M.G., Saetta M., Agusti A. "*Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease*" N Engl J Med June 4 2009; 360, 23.
23. Pace E., Ferraro M., Siena L., Melis M., Montalbano A., Johnson M., Bonsignore M.R., Bonsignore G., Gjomarkaj M. "*Cigarette smoke increases TLR4 and modifies LPS mediated responses in airway epithelial cells*" Immunology 2008; 124: 401-411.
24. Anthonisen N.R. et al. "*Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1*" The lung health study Jama 1994; 272: 1497-505.
25. Chong J., Poole P., Leung B., Black P.N. "*Phosphodiesterase 4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease*" Cochrane Database Syst Rev 2011 May 11; (5).

26. Giembycz M.A. *“Can the anti-inflammatory potential of PDE4 inhibitors be realized: guarded optimism or wishful thinking?”* Br J Pharmacol 2008; 155: 288-290.
27. Rennard S.I., Schachter N., Streck M., et al. *“Cilomilast for COPD: results of a 6-month, placebo-controlled study of a potent, selective inhibitor of phosphodiesterase 4”* Chest 2006; 129: 56–66.
28. Fabbri L.M., Calverley P.M., Izquierdo-Alonso J.L., Bundschuh D.S., Brose M., Martinez F.J., Rabe K.F. *“M2-127 and M2-128 study groups Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials”* Lancet 2009; 374: 695-703.
29. Barnes P.J. *“Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons”* Proc Am Thorac Soc 2005; 2 (4): 334-9.
30. Saetta M., Di Stefano A., Turato G., Facchini F.M., Corbino L., Mapp C.E., Maestrelli P., Ciaccia A., Fabbri L.M. *“CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease”* Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 822-826.
31. Kolble K. *“The LEICA microdissection system: design and applications”* J Mol Med 2000; 78: B24–B25.
32. Pace E., Siena L., Ferraro M., Profita M., Mondello P., Chiappara G., Montalbano A.M., Giarratano A., Bonsignore G., Gjomarkaj M. *“Role of prostaglandin E2 in the invasiveness, growth and protection of cancer cells in malignant pleuritis”* Eur J Cancer 2006; 42: 2382-2389.
33. Kao C.Y, Kim C., Huang F., Wu R. *“Requirements for Two Proximal NF- κ B Binding Sites and I κ B- ζ in IL-17A-induced Human β -Defensin 2*

Expression by Conducting Airway Epithelium” J Biol Chem 2008 May 30; 283(22): 15309–15318.

34. Pace E., Profita M., Melis M., Bonanno A., Paterno A., Mody C.H., Spatafora M., Ferraro M., Siena L., Vignola A.M., Bonsignore G., Gjomarkaj M. “*LTB4 is present in exudative pleural effusions and contributes actively to neutrophil recruitment in the inflamed pleural space*” Clin Exp Immunol 2004; 135:519-527.

35. Pace E., Gjomarkaj M., Melis M., Profita M., Spatafora M., Vignola A.M., Bonsignore G., Mody C.H. “*Interleukin-8 induces lymphocyte chemotaxis into the pleural space. Role of pleural macrophages*” Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 1592-1599

36. Petecchia L., Sabatini F., Varesio L., Camoirano A., Usai C., Pezzolo A., Rossi G.A. “*Bronchial Airway Epithelial Cell Damage Following Exposure to Cigarette Smoke Includes Disassembly of Tight Junction Components Mediated by the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway*” Chest 2009; 135: 1502-1512.

37. Imler J.L., Hoffmann J.A. “*Toll receptors in innate immunity*” Trends Cell Biol 2001; 11: 304-11.

38. Kim V., Rogers T.J., Criner G.J. “*New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease*” Proc Am Thorac Soc 2008 May 1; 5(4): 478-85.

39. Hogg J.C. “*Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease*” Lancet 2004; 364:709-21.

40. Pons J., Saulea J., Regueiro V., Santos C., López M., Ferrer J., Agustí A.G., Bengoechea J.A. “*Expression of Toll-like receptor 2 is up-*

regulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease” Respir Res 2006 ; 7: 64.

41. Droemann D., Goldmann T., Tiedje T., Zabel P., Dalhoff K., Schaaf B. *“Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients”* Respir Res 2005; 6: 68.

42. Imler J.L., Hoffmann J.A. *“Toll receptors in innate immunity”* Trends Cell Biol 2001; 11: 304-11.

43. MacRedmond R., Greene C., Taggart C.C., McElvaney N., O'Neill S. *“Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide”* Respir Res 2005; 6: 116.

44. Niyonsaba F., Ogawa H., Nagaoka I. *“Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils”* Immunology 2004; 111: 273-281.

45. Biragyn A., Ruffini P.A., Leifer C.A., Klyushnenkova E., Shakhov A., Chertov O., Shirakawa A.K., Farber J.M., Segal D.M., Oppenheim J.J., Kwak L.W. *“Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2”* Science 2002; 298: 1025-1029.

46. Busacker A., Newell J.D., Keefe Jr.T., Hoffman E..A., Granroth J.C., Castro M., Fain S., Wenzel S. *“A Multivariate analysis of Risk factors for Air trapping Asthmatic phenotype as measured by quantitative CT analysis”* Chest 2009; 135: 48-56.

47. Curtis J.L., Freeman C.M., Hogg J.C. *“The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research”* Proc Am Thorac Soc 2007; 4: 512-521.

48. Fellerman K., Stange D.E., Schaeffeler E., Schmalzl H., Wehkamp J., Bevins C.L., Reinisch W., Teml A., Schwab M., Lichter P., Radlwimmer B., Stange E.F. “*A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon*” *Am J hum Genet* 2006; 79: 439-448.
49. Kanda N., Watanabe S. “*Leptin enhances human beta-defensin-2 production in human keratinocytes*” *Endocrinology* 2008; 149: 5189-5198.
50. Bruno A., Chanez P., Chiappara G., Siena L., Giammanco S., Gjomarkaj M., Bonsignore G., Bousquet J., Vignola A.M. “*Does leptin play a cytokine-like role within the airways of COPD patients?*” *Eur Respir J* 2005; 26: 398-405.
51. Cosio M.G., Hale K.A., Niewoehner D.E. “*Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways*” *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 265-321.
52. Sethi, S., and T. F. Murphy. “*Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review*” *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 336-363
53. Pace E., Giarratano A., Ferraro M., Bruno A., Siena L., Mangione S., Johnson M., Gjomarkaj M. “*TLR4 upregulation underpins airway neutrophilia in smokers with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure*” *Hum Immunol* 2011; 72: 54-62.
54. O'Donnell R., Breen D., Wilson S., Djukanovic R. “*Inflammatory cells in the airways in COPD*” *Thorax* 2006; 61: 448-454.

55. Lapperre T.S., Sont J.K., Van Schadewijk A., Gosman M.M., Postma D.S., Bajema I.M., Timens W., Mauad T., Hiemstra P.S. “*GLUCOLD Study Group*” *Respir Res* 2007; 8:85.
56. Martorana P.A., Beume R., Lucattelli M., Wollin L., Lungarella G. “*Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke*” *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 848-853.
57. Gamble E., Grootendorst D.C., Brightling C.E. “*Antiinflammatory effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor cilomilast (Ariflo) in chronic obstructive pulmonary disease*” *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 976–982.
58. Boodoo S., Spannhake E.W., Powell J.D., Horton M.R. “*Differential regulation of hyaluronan-induced IL-8 and IP-10 in airway epithelial cells*” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L479–L486.
59. Herr C., Beisswenger C., Hess C., Kandler K., Suttrop N., Welte T., Schroeder J.M., Vogelmeier C., Bals R. for the CAPNETZ Study Group. “*Suppression of pulmonary innate host defence in smokers*” *Thorax* 2009; 64:144-149.
60. Sabroe I., Parker L.C., Dockrell D.H., Davies D.E., Dower S.K., Whyte M.K. “*Targeting the Networks that underpin contiguous immunity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*” *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 306-311.
61. Bateman E.D., Rabe K.F., Calverley P.M., Goehring U.M., Brose M., Bredenbroeker D., Fabbri L.M. “*Roflumilast with long-acting β_2 -agonist for COPD: influence of exacerbation history*” *Eur Respir J* 2011 Sep; 38(3): 553-60.